



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PIROPLASMOSE EQUINA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE
ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM
CAVALOS COM DOENÇA CLÍNICA E SUBCLÍNICA

CATARINA JOÃO GIL DE BARROS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

ORIENTADOR

Doutor Luís Ressano Garcia Pardon Lamas

Doutora Paula Alexandra Botelho Garcia
de Andrade Pimenta Tilley

CO-ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutor Luís Ressano Garcia Pardon Lamas

2018
LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PIROPLASMOSE EQUINA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE
ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM
CAVALOS COM DOENÇA CLÍNICA E SUBCLÍNICA

CATARINA JOÃO GIL DE BARROS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Paula Alexandra Botelho Garcia
de Andrade Pimenta Tilley

Doutor Luís Ressano Garcia Pardon Lamas

ORIENTADOR

Doutor Luís Ressano Garcia Pardon Lamas

CO-ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2018
LISBOA

Ao meu fiel companheiro há 19 anos, Simba

Agradecimentos

Ao meu orientador Professor Doutor Luís Lamas, obrigada por ter apostado em mim para a realização deste projeto, pela disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Agradeço também a oportunidade de poder integrar o Serviço de Cirurgia e Urgências de Equinos da FMV, pelo qual vou ter sempre um carinho muito especial.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Ana Duarte, agradeço por me ter recebido de braços abertos no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da FMV com a maior simpatia, por me ter desafiado constantemente e ter mostrado que trabalhar num laboratório é muito mais interessante do que alguma vez imaginei. Obrigada por todo o tempo que dedicou não só a este projeto mas também a mim.

À Professora Doutora Teresa Villa Brito, agradeço toda a amabilidade e disponibilidade que demonstrou para comigo nos últimos meses e por todos os conhecimentos que me transmitiu. À equipa do Laboratório de Análises Clínicas Professor M. Braço Forte, agradeço pela ajuda no processamento de todas as amostras. Ao Professor Telmo Nunes, agradeço toda a ajuda com a análise estatística.

Ao CIISA, agradeço o apoio financeiro que facilitou a realização deste projeto e permitiu a expansão dos objetivos relativamente ao mesmo.

À Mariana e à Teresa, obrigada por terem contribuído para que o meu ano de estágio se tornasse o melhor dos seis anos que passei na FMV. Obrigada pela amizade, paciência, ajuda, confiança e por acreditarem em mim. A todos os voluntários e estagiários do SCUE que demonstraram sempre tanto carinho para comigo, obrigada.

A todos os amigos que fiz na Faculdade, acreditando que alguns deles se manterão por muitos e muitos anos, obrigada por terem tornado esta longa e dura caminhada muito mais fácil e divertida, por todos os momentos que passámos juntos, desde as longas horas de estudo às festas na faculdade.

À Filipa Trigo da Roza, agradeço ter tido a oportunidade de te conhecer melhor, que fez com que queira levar esta amizade para além das paredes da faculdade que nos juntou. Obrigada pelas horas de diversão, pelos conselhos e pelo carinho que sei que tens por mim. Há coisas mesmo boas na vida!

Deixo um agradecimento especial a todos os veterinários referentes do Serviço de Cirurgia e Urgências de Equinos da FMV que colaboraram para este estudo através do envio das amostras analisadas. Agradeço ainda a todos os veterinários com que me fui cruzando ao longo dos últimos anos, e que foram fundamentais para que hoje tenha a certeza daquilo que quero fazer no meu futuro. Ao Ricardo, obrigada pelos conselhos preciosos, por acreditares em mim e por me mostrares desde o princípio que vai haver sempre algo mais para aprender.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, a minha segunda casa, que me viu entrar cheia de medos, e me vê “sair” com a certeza de que tudo valeu a pena, obrigada. Foram sem dúvida os seis anos mais difíceis mas mais gratificantes da minha vida.

Agradeço ao Tiago por ter sido um pilar fundamental e por todo o apoio ao longo dos últimos seis anos, tudo foi mais fácil ao teu lado. Obrigada por acreditares em mim, às vezes mais do que eu própria. Espero ser tão boa veterinária como o médico brilhante que sei que vais ser.

Por fim, queria agradecer à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã, principais espetadores da minha caminhada ao longo destes últimos seis anos. Obrigada por todo o carinho, paciência, incentivo e apoio. Espero ser sempre um motivo de orgulho para vocês. Um obrigada igualmente especial aos meus avós, pelo exemplo de trabalho e dedicação que são para mim.

Resumo

PIROPLASMOSE EQUINA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM CAVALOS COM DOENÇA CLÍNICA E SUBCLÍNICA

Atualmente, o PCR quantitativo (qPCR) constitui o teste de eleição para diagnóstico de infecções por *Theileria equi* e *Babesia caballi*. O papel dos marcadores da inflamação na piroplasmose equina (PE) permanece pouco estudado, não só no diagnóstico e monitorização mas também enquanto potenciais indicadores preditivos da doença.

Tendo em conta a natureza intracelular obrigatória dos agentes da PE, colocou-se a seguinte hipótese: a resposta inflamatória na PE difere da de outras doenças associadas a inflamação. Além disso, procurou responder-se às seguintes questões: 1) Qual a utilidade do hemograma e marcadores de inflamação aguda no diagnóstico precoce da PE? 2) Quais as vantagens da utilização do qPCR no diagnóstico da PE?

Os principais objetivos deste estudo foram: 1) Caracterizar e quantificar alterações do hemograma, proteínas totais, amilóide sérica A (SAA), fibrinogénio e ferro plasmáticos na PE; 2) Comparar os resultados obtidos entre cavalos com doença clínica (grupo PC) e subclínica (grupo SC); 3) Avaliar o valor diagnóstico destes testes para a PE clínica e outras causas de febre de origem inespecífica (grupo NS); 4) Determinar a carga parasitária em amostras positivas e comparar a sensibilidade da microscopia ótica, considerando os resultados obtidos por diagnóstico molecular.

Cada amostra foi submetida a qPCR para deteção de *T. equi* e *B. caballi*, análise hematológica, doseamento de proteínas totais, SAA, fibrinogénio e ferro plasmáticos.

Foram identificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no valor absoluto de monócitos entre os grupos PC-NS e PC-SC, na SAA entre os grupos PC-SC e no ferro plasmático entre os grupos PC-NS e PC-SC. 75% dos cavalos do grupo SC apresentaram neutrofilia sem desvio à esquerda. Apenas foram observadas formas de *T. equi* em esfregaços sanguíneos de cavalos com parasitémia igual ou superior a $7,2 \times 10^2$ parasitas/ μL .

Este estudo evidenciou não só as vantagens do qPCR no diagnóstico da PE, mas também que esta doença se caracteriza por uma resposta inflamatória associada a alterações do hemograma e de marcadores inflamatórios, em que o valor absoluto de monócitos, SAA e ferro plasmático constituíram os biomarcadores mais sensíveis para a deteção da doença.

Palavras-chave: *Theileria equi*; *Babesia caballi*; PCR; Resposta inflamatória; Hemograma; Esfregaço sanguíneo; Proteínas totais; Amilóide sérica A; Fibrinogénio; Ferro.

Abstract

EQUINE PIROPLASMOSIS: MOLECULAR DIAGNOSIS AND EVALUATION OF HEMATOLOGICAL AND INFLAMMATORY BIOMARKERS CHANGES IN HORSES WITH CLINICAL AND SUBCLINICAL DISEASE

Currently, real-time PCR (qPCR) is considered the best technique to diagnose *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections. Furthermore, the role of inflammatory biomarkers in equine piroplasmosis (EP) is still not clear, not only for diagnostic and monitoring purposes but also for its use as disease predictive indicators.

Considering the obligate intracellular nature of EP agents, the following hypothesis was set: the inflammatory response in EP differs from other inflammatory diseases. Moreover, the following questions were asked: 1) What is the usefulness of hemogram and acute inflammation markers in the early detection of EP?; 2) What are the advantages of using qPCR to diagnose EP?

The main goals of this study were: 1) To define and quantify changes in hemogram, total proteins, serum amyloid A (SAA), plasma fibrinogen and plasma iron in horses with EP; 2) To compare the obtained results between horses with clinical (PC group) and subclinical disease (SC group); 3) To evaluate the diagnostic value of hemogram and inflammation markers for EP and other causes of unknown origin fever (NS group); 4) To calculate the parasitemia in EP positive horses and compare the sensitivity of optic microscopy, considering the molecular diagnosis results.

Each sample was subjected to a qPCR for *T. equi* and *B. caballi* detection, hematological analysis and determination of total proteins, SAA, plasma fibrinogen and plasma iron.

There were significant differences ($p < 0,05$) in monocytes absolute value between PC-NS and PC-SC groups, in SAA between PC-SC groups and in plasma iron between PC-NS and PC-SC groups. A total of 75% SC group horses showed neutrophilia without left shift. *T. equi* was only found in bloodsmears that had a parasitemia equal or higher than $7,2 \times 10^2$ parasites/ μ L.

This study highlights the usefulness of qPCR in EP diagnosis and that this disease is characterized by an inflammatory response associated with hemograma and inflammatory markers changes, in which monocytes absolute value, SAA and plasmatic iron demonstrate higher sensitivity in the detection of EP.

Keywords: *Theileria equi*; *Babesia caballi*; PCR; Inflammatory response; Hemogram; Blood smear; Total Proteins; Serum amiloid A; Fibrinogen; Iron.

Índices

Índice geral

1. Relatório de atividades de estágio	1
2. Introdução	2
2.1. Piroplasmose equina	2
2.1.1. Epidemiologia	2
2.1.2. Etiologia	3
2.1.3. Transmissão	3
2.1.4. Ciclo de vida	4
2.1.5. Fisiopatologia	5
2.1.6. Imunidade	6
2.1.7. Sinais clínicos	8
2.1.8. Alterações laboratoriais	10
2.1.9. Alterações <i>post-mortem</i>	11
2.1.10. Diagnóstico	11
2.1.11. Tratamento	13
2.1.12. Prevenção	145
2.2. Resposta inflamatória aguda	16
2.2.1. Proteínas de fase aguda	17
2.2.1.1. Amilóide sérica A	19
2.2.1.2. Fibrinogénio plasmático	21
2.2.2. Ferro plasmático	22
2.3. Biomarcadores de inflamação	23
2.3.1. Diagnóstico de resposta inflamatória aguda	23
2.3.2. Estabelecimento de prognóstico	25
2.3.3. Monitorização da resposta à terapêutica	266
2.3.4. Monitorização de complicações pós-cirúrgicas	26
2.3.5. Biomarcadores da inflamação na prática clínica	27
3. Objetivos do estudo	28
4. Material e métodos	29
4.1. Recolha e envio das amostras	29
4.2. Diagnóstico molecular	30
4.2.1. Extração de DNA total	30
4.2.2. PCR quantitativo	30
4.2.3. <i>Nested</i> PCR	33
4.2.4. Determinação da parasitemia	35
4.3. Análise hematológica	38
4.4. SAA	38
4.5. Proteínas totais e fibrinogénio plasmático	38
4.6. Ferro plasmático	39
4.7. Análise estatística	39
5. Resultados	41
5.1. Caracterização e descrição clínica da amostra	41
5.2. qPCR e nPCR	42
5.3. Determinação da parasitemia e comparação com os resultados da observação microscópica do esfregaço sanguíneo	43
5.4. Sinais clínicos	44
5.5. Hemograma	44
5.6. Esfregaço sanguíneo	45

5.7. Proteínas totais, SAA, fibrinogénio e ferro plasmáticos	46
6. Discussão	47
6.1. Caracterização da amostra	47
6.1.1. Prevalência dos agentes da PE em cavalos com febre de origem inespecífica e portadores assintomáticos da doença	47
6.1.2. Sinais clínicos	47
6.2. Técnica de qPCR na deteção e quantificação de <i>T. equi</i> e <i>B. caballi</i>	48
6.3. Caracterização das alterações hematológicas na piroplasmose equina	49
6.3.1. Hemograma	49
6.3.2. Esfregaço sanguíneo	50
6.4. Caracterização das alterações em biomarcadores de resposta inflamatória na piroplasmose equina	51
6.4.1. SAA e ferro plasmático	51
6.4.2. Proteínas totais e fibrinogénio plasmático	53
6.5. Limitações do estudo e perspetivas futuras	54
7. Conclusão	55
8. Bibliografia	56
9. Anexos	69

Índice de figuras

Figura 1 – Perfil cinético das proteínas de fase aguda e da contagem de células brancas durante a resposta inflamatória.....	17
Figura 2 – Sequência consenso obtida após alinhamento das sequências delimitadas pelos <i>primers reverse</i> e <i>forward</i> para uma amostra positiva a <i>T. equi</i> no qPCR e posteriormente submetida a nPCR	34
Figura 3 – Curvas de qPCR obtidas para cada uma das diluições de plasmídeo recombinante realizadas para <i>T. equi</i> e <i>B. caballi</i> , respetivamente.....	36
Figura 4 – Retas padrão para determinação da carga parasitária de <i>T. equi</i> e <i>B. caballi</i> , respetivamente, em função do CT	37
Figura 5 – Curvas de qPCR obtidas para 10 amostras positivas a <i>T. equi</i> e para o controlo positivo do respetivo agente	42
Figura 6 – Resultado da observação do gel de eletroforese para 6 amostras positivas a <i>T. equi</i> no qPCR e posteriormente submetidas a nPCR.....	43
Figura 7 – Valor absoluto de monócitos (expresso em células/ μ L de sangue) em função do grupo em estudo.....	45
Figura 8 – Concentração plasmática de ferro (expressa em μ g/dL) em função do grupo em estudo.....	46

Índice de tabelas

Tabela 1 – Variação da concentração plasmática das proteínas de fase aguda mais utilizadas em clínica de equinos durante a resposta inflamatória aguda.....	18
Tabela 2 – Pico de concentração plasmática de SAA em doenças/situações recorrentes em clínica de equinos	20
Tabela 3 – Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> e sondas utilizados na reação de qPCR para detecção de <i>T. equi</i> e <i>Babesia</i> spp.....	32
Tabela 4 – Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> (<i>outer</i> e <i>inner</i>) utilizados no nPCR para detecção de <i>T. equi</i> e <i>B. caballi</i>	33
Tabela 5 – Fórmulas dos plasmídeos recombinantes utilizados como controlos positivos de <i>T. equi</i> e <i>B. caballi</i> e na determinação da carga parasitária de cada uma das amostras positivas	35
Tabela 6 – Caracterização dos grupos PC, NS e SC considerados neste estudo	39
Tabela 7 – Valores de $\bar{x} \pm \sigma$ e $\tilde{x} + IQR$ registados para os respetivos parâmetros de proteínas totais, ferro plasmático, SAA e fibrinogénio plasmático.....	46

Abreviaturas e símbolos

°C	Graus Celsius
®	Marca registada
AE	Tampão de eluição
AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
AL	Tampão de desnaturação
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AW1	Tampão de lavagem 1
AW2	Tampão de lavagem 2
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cELISA	<i>Competition enzyme linked immunosorbent assay</i>
CFT	Teste de fixação do complemento
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CID	Coagulação intravascular disseminada
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
CT	<i>Cycle threshold</i>
DI	Dipropionato de imidocarb
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EMA-1	<i>Equine merozoite antigen 1</i>
EMA-2	<i>Equine merozoite antigen 2</i>
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
g	Força gravítica
GGT	Gama glutamil transpeptidase
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
IFAT	Teste de imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferão gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IQR	Intervalo interquartil
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
KWPN	<i>Koninklijk Warmbloed Paardenstamboek Nederland</i>
L	Litro
mg	Miligramma
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
nPCR	Teste <i>nested</i> de reação em cadeia da polimerase
OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i>
pb	Pares de bases
PE	Piroplasmose equina
pg	Pictograma
qPCR	Teste quantitativo de reação em cadeia da polimerase
RAP-1	<i>Rhoptry associated protein-1</i>

RDW	<i>Red blood cell distribution width</i>
rRNA	Ácido ribonucleico recombinante
SAA	Amilóide sérica A
SCUE	Serviço de Cirurgia e Urgências de Equinos
TM	Marca comercial
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	Teste de sensibilidade a antibióticos
UV	Ultravioleta
V	Volts
VCM	Volume corpuscular médio
WAHIS	<i>World Animal Health Information System</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

1. Relatório de atividades de estágio

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), o estágio curricular foi realizado entre 1 de Novembro de 2017 e 31 de Janeiro de 2018, sob orientação do Professor Doutor Luís Ressano Garcia Pardon Lamase co-orientação da Professora Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte. Este estágio foi realizado em clínica de equinos em exclusividade no Serviço de Cirurgia e Urgências de Equinos (SCUE) da FMV-UL, incluindo não só dias úteis mas também fins de semana e frequentemente fora de horas. Sendo o SCUE FMV-UL um hospital de referência, surgiu a oportunidade de seguir uma grande diversidade de casos, adquirindo novos conhecimentos em diversas áreas da clínica de equinos, nomeadamente cuidados intensivos, medicina interna, medicina desportiva, diagnóstico por imagem, cirurgia e anestesia.

Para além dos conhecimentos teóricos adquiridos, foi possível a realização de diversas tarefas práticas, nomeadamente discussão de casos clínicos, realização de exames físicos, administração de medicamentos, admissão de emergências, colocação de cateteres centrais, realização de entubação nasogástrica, ecografia, radiografia, endoscopia, bloqueios perineurais e procedimentos de dentisteria, mudança de pensos, assistência em cirurgias enquanto ajudante de cirurgião ou circulante e realização de anestésias gerais.

Considerando a natureza dos casos clínicos, foi acompanhada a admissão e evolução de casos de cólica (tanto de resolução médica como cirúrgica), hérnias incisionais, lacerações, fraturas, tenopatias, osteocondrite dissecante, laminite, sinusites secundárias a infeção dentária, hemiplegia laríngea, neoplasias oculares, politraumatismo e urolitíase.

Durante o período do estágio curricular, foram recebidas e processadas as amostras de sangue enviadas pelos veterinários referentes do SCUE FMV-UL. Posteriormente, foram executadas técnicas para doseamento de proteínas totais, SAA e fibrinogénio plasmático. Tanto o hemograma como o doseamento do ferro plasmático foram realizados pela equipa do Laboratório de Análises Clínicas Professor M. Braço Forte da FMV-UL.

Relativamente ao diagnóstico molecular dos agentes da piroplasmose equina, realizado no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da FMV-UL, surgiu a oportunidade de acompanhar o processo de diagnóstico por PCR quantitativo e de executar algumas tarefas, nomeadamente extração, quantificação e purificação de DNA, realização de PCR convencional e observação de géis de eletroforese em transiluminador de radiação ultravioleta, o que permitiu complementar a natureza essencialmente clínica do estágio com uma componente laboratorial.

2. Introdução

2.1. Piroplasmose equina

A piroplasmose equina (PE) é uma doença parasitária causada por *Theileria equi* e *Babesia caballi*, hemoparasitas transmitidos principalmente por vetores ixodídeos (Friedhoff, Tenter & Muller, 1990). Todas as espécies de equinos podem ser infetadas, apesar de existirem poucos registos de doença clínica em burros, mulas e zebras (Tamzali, 2013)

O quadro agudo da doença é caracterizado por anemia hemolítica de gravidade variável e sinais clínicos pouco específicos. No entanto, muitos dos animais infetados desenvolvem doença subclínica, tornando-se portadores assintomáticos e consequentemente reservatórios para transmissão da doença a animais não infetados (Rothschild, 2013).

O impacto económico da PE na indústria equestre é significativo, considerando a morbilidade associada à doença e o período de recuperação necessário após tratamento médico, que inevitavelmente podem comprometer a carreira de cavalos atletas afetados. Além disso, nos últimos anos têm sido crescentes as restrições à entrada e saída de cavalos infetados em países não-endémicos, nomeadamente Inglaterra, Estados Unidos e Austrália, sejam os animais destinados à venda ou participação em competições (Thiemann & Phipps, 2009; *World Organisation for Animal Health* [OIE], 2018). Por estes motivos, e sendo a PE endémica em Portugal, esta doença tem vindo a tornar-se cada vez mais um fator limitante à internacionalização de cavalos de raça portuguesa, nomeadamente os Puro Sangue Lusitano.

2.1.1. Epidemiologia

A PE é uma doença de declaração obrigatória à OIE (OIE, 2018). No entanto, existem discrepâncias significativas entre a literatura publicada e os dados oficiais, uma vez que nem todos os países reportam a doença (Heuchert, de Giulli Jr, de Athaide, Böse & Friedhoff, 1999; Moretti et al., 2010; Mujica et al., 2011; Salim, Bakheit, Kamau & Sugimoto, 2013; *World Animal Health Information System* [WAHIS], 2018).

Apesar da distribuição cosmopolita, *T. equi*, *B. caballi* e os seus vetores naturais são endémicos em regiões de clima tropical e subtropical (de Waal, 1992), nomeadamente no Sul da Europa, Médio Oriente, Ásia, África e América Latina (WAHIS, 2018). Apesar de existirem poucos dados disponíveis sobre a prevalência da PE em Portugal, estima-se que esta se tenha mantido sem grandes alterações nas últimas décadas, variando entre 45 e 65% da população de equinos, colocando o país com um estatuto endémico para a doença (Sabino-Serra, da Fonseca, de Carvalho & Carvalho-Varela, 1993; Vinhas, 2014).

Nas regiões endêmicas, a maioria dos equinos encontra-se exposta à doença desde o primeiro ano de vida, com uma taxa de mortalidade associada variável entre 5 e 10%. Por outro lado, a importação e introdução de equinos infetados em regiões não endêmicas onde co-existam vetores competentes reflete-se frequentemente em taxas de mortalidade superiores a 50% (Rothschild, 2013).

A tendência crescente para a globalização da indústria equestre, associada à intensificação das alterações climáticas, falta de estabelecimento de medidas de vigilância e barreiras entre alguns países, tornou o controlo da expansão geográfica da PE e dispersão dos seus vetores naturais uma das principais preocupações das regiões não endêmicas (Wise, Kappmeyer, Mealey & Knowles, 2013).

2.1.2. Etiologia

Theileria equi e *Babesia caballi* são hemoprotozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e família Piroplasmidae (Kappmeyer et al., 2012).

A classificação taxonómica de *T. equi*, reconhecida até ao final do século XX como *Babesia equi* (Melhorn & Schein, 1998), tem-se mantido controversa ao longo dos últimos anos, dadas algumas particularidades do seu ciclo de vida, nomeadamente a existência de uma fase inicial de multiplicação em linfócitos precedente à invasão eritrocitária, a morfologia característica do estadio de merozoíto (“cruz de Malta”) e a inexistência de transmissão transovárica do parasita nos seus vetores naturais (Rothschild, 2013). Um estudo genómico recente sugeriu a reclassificação filogenética de *T. equi* num novo género, tendo em conta as diferenças identificadas na sequência genética deste hemoparasita comparativamente a outras espécies do género *Theileria*, nomeadamente *Theileria annulata* e *Theileria parva*, agentes da piroplasmose bovina (Kappmeyer et al., 2012).

2.1.3. Transmissão

A transmissão de *T. equi* e *B. caballi* ocorre essencialmente através de vetores ixodídeos. No entanto, apesar de menos comuns, existem outras fontes possíveis de transmissão, nomeadamente iatrogénica (Wise et al., 2013) e, no caso de *T. equi*, transplacentária (Allsopp, Lewis & Penzhorn, 2007; Sant et al., 2016).

As principais espécies de ixodídeos responsáveis pela transmissão de *T. equi* e *B. caballi* são *Rhiphicephalus* sp., *Dermacentor* sp. e *Hyalomma* sp.. Além destas, foi identificada a possibilidade de transmissão de *T. equi* por *Amblyomma cajannense*. Uma vez que a maioria

destes vetores é comum a ambos os hemoparasitas e a sua distribuição geográfica é semelhante, as coinfeções de *T. equi* e *B. caballi* são bastante frequentes (Rothschild, 2013). O ciclo de vida dos ixodídeos compreende quatro estádios: ovo, larva, ninfa e adulto. A transmissão de *B. caballi* nos seus vetores naturais é transtadial e transovárica, o que permite a persistência do hemoparasita entre gerações de ixodídeos. Assim, tanto equídeos como ixodídeos infetados são considerados reservatórios para *B. caballi*. Pelo contrário, equídeos infetados com *T. equi* constituem o único hospedeiro reservatório deste hemoparasita, uma vez que a transmissão do mesmo nos seus vetores naturais é essencialmente transtadial, não ocorrendo transmissão de *T. equi* entre gerações de vetores (Ueti et al., 2012).

A transmissão de *T. equi* e *B. caballi* para os hospedeiros vertebrados ocorre após fixação de fêmeas adultas infetadas, que ao realizarem uma alimentação do tipo hematófago inoculam a forma infetante dos hemoparasitas em circulação, através da saliva (Ueti, Palmer, Scoles, Kappmeyer & Knowles, 2008).

A transmissão iatrogénica de *T. equi* e *B. caballi* pode ocorrer durante a reutilização de material contaminado (agulhas, seringas, instrumentos cirúrgicos, instrumentos de dentisteria) ou durante a realização de transfusões com sangue de dadores portadores assintomáticos da doença (Tamzali, 2013).

Vários estudos reportam casos de transmissão transplacentária de *T. equi* no primeiro trimestre de gestação (Allsopp et al., 2007; Rego, 2008), podendo este modo de transmissão estar associado à ocorrência de abortos, partos prematuros ou ao nascimento de poldros portadores assintomáticos (Allsopp et al., 2007; Georges et al., 2011; Chhabra, Ranjan, Uppal & Singla, 2012; Sant et al., 2016).

2.1.4. Ciclo de vida

Os eritrócitos constituem as únicas células alvo de *B. caballi*, tal como se verifica na maioria das espécies pertencentes ao género *Babesia* (Mehlhorn & Schein, 1998). Pelo contrário, o ciclo de vida de *T. equi* é marcado por uma fase de desenvolvimento e multiplicação extraeritrocitária, sendo tanto linfócitos como eritrócitos células alvo deste hemoparasita (Ramsay et al., 2013).

Os esporozoítos representam a forma infetante de *T. equi* e *B. caballi* para o hospedeiro vertebrado (Wise et al., 2013). Uma vez em circulação, os esporozoítos de *B. caballi* invadem diretamente os eritrócitos, nos quais se multiplicam e desenvolvem assexuadamente em trofozoítos e posteriormente em merozoítos. Pelo contrário, os esporozoítos de *T. equi* invadem inicialmente linfócitos, nos quais se reproduzem

assexuadamente originando esquizontes e só posteriormente merozoítos, que são então libertados na circulação sistêmica e iniciam a invasão eritrocitária (Tamzali, 2013). A reprodução assexuada de merozoítos de *T. equi* nos eritrócitos, além de originar a produção de formas parasitárias semelhantes, pode também resultar na produção de gametócitos (Moltmann, Mehlhorn, Schein, Voigt & Friedhoff, 1983; Mehlhorn & Schein, 1998).

A acumulação de merozoítos de *T. equi* e *B. caballi* nos eritrócitos acaba por provocar a sua lise e consequente libertação das formas parasitárias em circulação, resultando na invasão de novas células alvo (Wise et al., 2013).

Os eritrócitos infetados em circulação podem ser ingeridos durante a alimentação dos ixodídeos, aumentando substancialmente o número de vetores naturais competentes para a transmissão da doença. Assim, após ingestão de merozoítos de *B. caballi* e/ou merozoítos e gametócitos de *T. equi*, algumas dessas formas sobrevivem no abdómen e reproduzem-se assexuadamente em gametócitos, que por sua vez se reproduzem sexuadamente originando zigotos (Rothschild, 2013). Posteriormente, os oocinetos (zigotos móveis) penetram o abdómen e através da hemolinfa atingem as glândulas salivares do vetor, onde finalmente se multiplicam e desenvolvem assexuadamente nas formas infetantes para os hospedeiros vertebrados, os esporozoítos (Mehlhorn & Schein, 1998).

2.1.5. Fisiopatologia

Tipicamente, as infeções por *T. equi* e *B. caballi* resultam em quadros de anemia hemolítica de gravidade variável, associada à ocorrência de hemólise intravascular, por rotura dos eritrócitos devido à acumulação intracelular de merozoítos, e hemólise extravascular, que ocorre durante o sequestro de eritrócitos infetados por macrófagos esplénicos (Wise et al., 2013).

O fenómeno de hemólise é caracterizado pela libertação de hemoglobina em circulação e aumento dos níveis séricos de bilirrubina não conjugada, que se deposita nas membranas mucosas e nalguns casos lhes confere uma coloração amarelada (Rothschild, 2013). Em casos de hemólise grave, normalmente associadas a infeções por *T. equi*, é frequente a presença de hemoglobinúria e bilirrubinúria. Uma vez que estes pigmentos apresentam propriedades hepato e nefrotóxicas, o aumento excessivo da sua concentração plasmática pode repercutir-se no desenvolvimento de insuficiência hepática e insuficiência renal aguda (de Wall, 1992).

Num estudo realizado por Ambawat, Malhotra, Kumar & Dhar (1999) que utilizou grupos de burros positivos à PE com parasitémias crescentes, foram registadas alterações

bioquímicas tanto mais significativas quanto maior a carga parasitária, nomeadamente ao nível das proteínas de membrana e composição lipídica dos eritrócitos. Estas alterações, associadas a um aumento da concentração plasmática de malondialdeído, indicador de peroxidação lipídica, contribuem para a ocorrência de hemólise, além de provocarem um aumento da rigidez e diminuição da elasticidade dos eritrócitos, reduzindo o fluxo sanguíneo microvascular. Noutro estudo mais recente, que avaliou a resposta antioxidante do organismo em cavalos e mulas naturalmente infetados com *T. equi* e *B. caballi*, foi registado um aumento significativo da concentração plasmática de nitrato (produto da oxidação do óxido nítrico) e malondealdeído e uma diminuição significativa da concentração plasmática de glutathione e vitamina E, elementos associados ao mecanismo de defesa intracelular contra o *stress* oxidativo (Deger, Deger, Bicek, Ozdal & Gul, 2009).

Alguns estudos identificaram uma diminuição no número de plaquetas em cavalos com piroplasmose. No entanto, o mecanismo fisiopatológico associado a esta alteração não se encontra totalmente esclarecido, embora existam algumas teorias, nomeadamente a ocorrência de destruição imunomediada das mesmas, aumento do sequestro por macrófagos esplénicos ou aumento do consumo em casos de coagulação intravascular disseminada (CID) (Allen, Frerichs & Holbrook, 1975).

Nas infeções por *T. equi*, o quadro clínico tende a apresentar maior gravidade, estando principalmente relacionado com a anemia hemolítica provocada pelo agente. Por outro lado, equinos infetados com *B. caballi* apresentam geralmente um quadro clínico mais ligeiro. Apesar de também poderem ser identificados sinais relacionados com a anemia, os principais sinais clínicos nas infeções por este agente, quando evidentes, relacionam-se predominantemente com a formação de microtrombos constituídos por eritrócitos infetados, que provocam obstrução de pequenos vasos e consequentemente estase sanguínea. Assim, é desencadeada uma resposta inflamatória sistémica, que quando associada a trombocitopenia pode provocar alterações do endotélio, aumento da permeabilidade vascular e em casos mais graves CID e falência multiorgânica (de Wall, van Heerden & Potgieter, 1987).

2.1.6. Imunidade

A resposta imunitária desencadeada nas infeções por *T. equi* e *B. caballi* desempenha um papel fundamental no controlo da doença e manutenção da condição de portador assintomático. Particularmente nas regiões endémicas para a PE, os baixos níveis de parasitemia característicos dos animais aí presentes permitem uma estimulação contínua do

sistema imunitário e consequentemente uma maior resistência ao desenvolvimento de doença clínica (Tamzali, 2013).

A imunidade inata mediada por neutrófilos, macrófagos e células *natural killer* constitui o mecanismo de defesa inicial contra a infecção (Tamzali, 2013). Segundo Hanafusa et al. (1998), a produção de óxido nítrico por macrófagos apresenta um papel essencial no controlo de infeções por *B. caballi*.

O baço apresenta igualmente um papel fundamental na resposta primária do sistema imunitário à PE (Rothschild, 2013), uma vez que a fagocitose realizada por macrófagos esplénicos permite a eliminação de eritrócitos infetados pelos hemoparasitas (Allen et al., 1975).

Apesar da importância inegável da resposta imunitária inata, estudos provaram que a imunidade adquirida mediada por anticorpos constitui o principal mecanismo de defesa contra a PE (Kuttler et al., 1986; Knowles Jr et al., 1994). Infeções por *T. equi* e *B. caballi* desencadeiam uma forte resposta humoral (Cunha et al., 2006), sendo o título de anticorpos produzidos diretamente proporcional ao grau de imunidade (Kuttler et al., 1986). Segundo um estudo que avaliou a produção de anticorpos em infeções por *T. equi*, a fase aguda da infecção caracteriza-se pela produção de anticorpos IgGa e IgGb, enquanto que os anticorpos IgG(T) são apenas produzidos na fase crónica da infecção (Cunha et al., 2006). Além disso, infeções por este agente desencadeiam a produção de anticorpos específicos contra antígenos expostos à superfície dos merozoítos, denominados *equine merozoite antigen* (EMA-1 e EMA-2), enquanto que nas infeções por *B. caballi* são produzidos anticorpos específicos contra pequenas proteínas de superfície dos merozoítos e esporozoítos, as *rhoptry associated protein-1* (RAP-1) (Mosqueda et al., 2002; Yokoyama et al., 2006).

Para além da imunidade humoral, a resposta imunitária celular também apresenta um papel crucial no controlo de infeções por *T. equi* e *B. caballi* (Hall et al., 2002), nomeadamente através da produção de interferão γ (IFN- γ) por linfócitos T *helper* CD4+ (Rothschild, 2013).

A transferência de imunidade passiva através da ingestão de colostro nas primeiras horas de vida permite que poldros nascidos de mães portadoras de PE se mantenham protegidos durante os primeiros 4 a 5 meses de vida (Donnelly et al., 1982). No entanto, a possibilidade de transmissão transplacentária de *T. equi* a partir de éguas portadoras assintomáticas pode resultar em aborto tardio, piroplasmose neonatal (Chhabra et al., 2012) ou no nascimento de poldros aparentemente saudáveis embora portadores assintomáticos deste hemoparasita (Allsopp et al., 2007).

Cavalos que desenvolvem o quadro agudo, subagudo ou crónico da doença, particularmente se infetados com *T. equi*, tornam-se frequentemente portadores assintomáticos, caracterizados pela persistência de 10^3 a 10^6 eritrócitos infetados por mililitro de sangue, parasitêmia suficiente para que vetores ixodídeos se infetem e adquiram capacidade de transmissão da doença a outros equinos (Ueti et al., 2008). Estudos sugerem que o desenvolvimento de infeção persistente por *T. equi* se relaciona com a presença de genes específicos codificadores dos antígenos EMA, cuja expressão permite a evasão do hemoparasita ao sistema imunitário do hospedeiro (Kappmeyer et al., 2012).

Apesar dos vários ensaios realizados no âmbito da avaliação de estratégias de imunização contra a PE, atualmente ainda não existe nenhuma vacina eficaz contra a doença (Tamzali, 2013).

2.1.7. Sinais clínicos

O quadro agudo da PE caracteriza-se por sinais sistémicos pouco específicos, sendo a febre o sinal clínico mais comum, atingindo por vezes valores superiores a 40°C. Outros sinais frequentemente observados são anorexia, perda de peso, letargia e depressão (Zobba et al. 2008). Alterações associadas à anemia hemolítica incluem fraqueza, membranas mucosas pálidas ou ictericas, taquicardia, taquipneia e pigmentúria, sendo rara a observação da última em infeções por *B. caballi* (Ambawat et al., 1999; Zobba et al., 2008). Além disso, podem ser identificadas petéquias nas membranas mucosas, associadas à presença de trombocitopénia (Wise et al., 2013).

Apesar de menos comuns, nalguns casos agudos observa-se edema distal dos membros, linfadenomegália, desidratação, astenia, mialgia e lombalgia. Em casos mais graves, alguns equinos também chegam a desenvolver sinais de cólica, edema pulmonar, pneumonia, arritmias, laminite, insuficiência renal aguda, insuficiência hepática e alterações do sistema nervoso central, registando-se uma taxa de mortalidade superior em infeções por *T. equi* (Rothschild, 2013).

A PE hiperaguda caracteriza-se pelo aparecimento fulminante dos sinais clínicos característicos do quadro agudo, frequentemente associados a colapso e morte súbita. Este quadro ocorre tipicamente após introdução de equinos portadores assintomáticos em regiões não endémicas com vetores da doença, após introdução de cavalos saudáveis em regiões endémicas (Wise et al., 2013), em equinos portadores assintomáticos submetidos a exercício físico intenso (Hailat, Lafi, al-Darraj & al-Ani, 1997) ou em neonatos infetados *in utero* por transmissão transplacentária (Phipps & Otter, 2004).

Apesar de alguns neonatos desenvolverem sinais clínicos apenas 2 a 3 dias após o parto, a piroplasmose neonatal é caracterizada por fraqueza ao nascimento e rápido desenvolvimento de outros sinais, nomeadamente depressão, diminuição do reflexo de sucção, decúbito prolongado, anemia e icterícia graves. Podem ainda ser observadas petéquias nas membranas mucosas e hemoglobinúria (Erbsloh, 1975; Silvey, 1996). Dadas as semelhanças entre estes sinais clínicos e os observados na isoeritrólise neonatal, a PE neonatal tende a ser subdiagnosticada (Chhabra et al., 2012).

No quadro subagudo da PE ocorre uma manifestação mais ligeira dos sinais clínicos. No entanto, se não sujeitos a tratamento médico adequado, equinos com doença subaguda podem sofrer um agravamento da anemia e do quadro clínico geral (Rothschild, 2013).

Infeções crónicas por *T. equi* e *B. caballi* resultam geralmente em anemia ligeira e história pregressa de intolerância ao exercício, letargia, anorexia, perda de peso e diminuição da condição corporal. Nestes casos deteta-se frequentemente esplenomegália, relacionada com a persistência do fenómeno de hemólise extravascular (Allen et al., 1975). Um estudo recente diagnosticou miopatia inflamatória em cavalos com quadro crónico de PE, considerando o envolvimento de uma resposta autoimune associada a uma sobreexpressão de citocinas pró-inflamatórias, responsável por degenerescência e atrofia miofibrilar (Pasolini et al., 2018).

Principalmente nas regiões endémicas, a maioria dos equinos infetados com *T. equi* e/ou *B. caballi* tornam-se portadores assintomáticos destes agentes, com baixos níveis de parasitemia e sem manifestação óbvia de sinais clínicos, resultado de um equilíbrio delicado entre a infeção parasitária e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Estes animais comportam-se como reservatórios dos hemoparasitas, representando o principal desafio nas regiões não endémicas para a doença, principalmente no que diz respeito à identificação precoce e prevenção da introdução de animais portadores nessas regiões (Ueti et al., 2008).

A maioria dos equinos infetados com *T. equi* permanece portador do agente para o resto da vida, independentemente da resolução dos sinais clínicos ocorrer espontaneamente ou com recurso a tratamento médico adequado (Rothschild, 2013). No entanto, num estudo de Grause et al. (2013), a realização de tratamento com dipropionato de imidocarb de 6 cavalos previamente diagnosticados como positivos a *T. equi* permitiu a eliminação completa do agente em 5 animais, confirmada por técnicas de diagnóstico serológico e molecular.

As infeções por *B. caballi* parecem seguir uma evolução autolimitante, muitas vezes deixando de ser possível a deteção do agente no seu hospedeiro vertebrado (Rothschild, 2013).

Estudos reportam a reagudização da PE em portadores assintomáticos associada a episódios de *stress*, exercício físico intenso, imunossupressão e administração de corticosteróides (Oladosu & Olufemi, 1992; Hailat et al., 1997). Apesar de mais frequentes nas infeções por *T. equi*, estes episódios também já foram identificados em cavalos portadores de *B. caballi* (Rothschild, 2013).

2.1.8. Alterações laboratoriais

As principais alterações hematológicas observadas em cavalos com piroplasmose incluem anemia de gravidade variável, diminuição da concentração de hemoglobina e trombocitopénia. Apesar do hematócrito raramente ser inferior a 20%, devido à rápida resposta da medula óssea que caracteriza a anemia regenerativa, nalgumas infeções agudas e hiperagudas por *T. equi* associadas a hemólise grave podem ser registados valores de hematócrito próximos de 10% (Zobba et al., 2008). Além disso, é comum o registo de alterações dos índices eritrocitários hemoglobina corpuscular média (HCM), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Ambawat et al., 1999).

As infeções agudas caracterizam-se pela presença de neutrofilia, geralmente com desvio à esquerda, e linfopénia (Rothschild, 2013). Alguns ensaios em cavalos infetados experimentalmente com *B. caballi* revelaram alterações significativas no leucograma, identificando-se de forma consistente a presença de eosinopénia e monocitose na fase inicial da doença (Holman, Frerichs, Chieves & Wagner, 1993).

Relativamente às análises bioquímicas, a alteração mais frequentemente descrita é a presença de hiperbilirrubinémia (Zobba et al., 2008). Além disso, devido ao comprometimento do aporte sanguíneo ao fígado e toxicidade dos pigmentos libertados em circulação, a concentração plasmática das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transpeptidase (GGT) também pode sofrer aumentos consideráveis (Wise et al., 2013).

No que diz respeito às proteínas de inflamação, a concentração plasmática de fibrinogénio encontra-se frequentemente aumentada nos casos mais graves, embora o registo destes aumentos ocorra apenas 2 a 3 dias após o início dos sinais clínicos. Apesar de menos comum, nalguns casos é registada uma diminuição da concentração plasmática desta proteína, frequentemente associada ao desenvolvimento de CID e insuficiência hepática aguda (Tamzali, Guelfi & Braun, 2001). Um estudo recente avaliou a resposta de diversas proteínas de fase aguda em cães naturalmente infetados com *Babesia canis*, registando

aumentos significativos na amilóide sérica A (Matijatko et al., 2007), proteína de fase aguda frequentemente utilizada em clínica de equinos. No entanto, os resultados obtidos num estudo de Gonzalez-Miranda (2017) não revelaram diferenças significativas nesta proteína entre cavalos positivos a *T. equi* com sintomatologia clínica e o grupo de controlo, representado por cavalos saudáveis.

Principalmente em infeções por *T. equi*, é possível a identificação de hipofosfatémia e hipoferrémia associadas ao fenómeno de hemólise (Frerichs & Holbrook, 1974). Além disso, Borges, Divers, Stokol & Mohammed (2007) sugeriram que, de forma semelhante ao já reportado para espécie humana (Knutson, 2017), a diminuição da concentração plasmática de ferro durante a resposta inflamatória em equinos constitui um mecanismo de defesa do organismo no combate à perpetuação da infeções.

2.1.9. Alterações *post-mortem*

As alterações identificadas durante o exame de necrópsia e avaliação histopatológica variam consoante a gravidade da doença e complicações associadas. Macroscopicamente, é frequente a identificação de membranas mucosas pálidas ou ictéricas e esplenomegália. Apesar de menos comuns, outras alterações possíveis incluem congestão e edema pulmonar, hemopericárdio, hidropericárdio, hidrotórax, ascite, hepatomegália, renomegália e linfadenopatia (de Waal, 1992). Ao exame histopatológico, podem ser observados microtrombos nos capilares hepáticos e pulmonares, congestão e edema pulmonar, inclusões de hemossiderina em macrófagos esplénicos e pulmonares, necrose centrolobular hepática e necrose tubular renal (Wise et al., 2013). Por fim, além de poderem ser identificadas formas intraeritrocitárias de *T. equi* ou *B. caballi*, devido às particularidades do ciclo de vida de *T. equi*, também podem ser observados esquizontes no interior de linfócitos (de Waal, 1992).

2.1.10. Diagnóstico

Considerando a inespecificidade dos sinais clínicos associados à PE, o diagnóstico clínico *per se* não permite a obtenção de um diagnóstico definitivo. Na avaliação de cavalos que apresentem este tipo de sintomatologia, além da PE deve ser considerada uma lista de outros diagnósticos diferenciais, nomeadamente anemia infecciosa equina, púrpura hemorrágica, erliquiose, anemia hemolítica imunomediada, artrite viral equina, intoxicação por *Acer rubrum*, doença equina africana (Alward et al., 2006) e infeção por *Trypanosoma* (de Wall, 1992).

Atualmente existem diversos testes de diagnóstico para a PE, podendo ser executados isoladamente ou em combinação. A realização de vários testes de diagnóstico justifica-se principalmente nas regiões não endêmicas, permitindo a obtenção de informação mais precisa, importante para o estabelecimento de medidas de controlo adequadas (Wise et al., 2013).

A avaliação microscópica de esfregaços sanguíneos permite a observação direta de formas intraeritrocitárias de *T. equi* e *B. caballi*, nomeadamente micromerozoítos e, nas infeções por *B. caballi*, trofozoítos. Além disso, no caso de *T. equi* podem ainda ser identificadas formas esquizogónicas do parasita no interior de linfócitos (Friedhoff & Soulé, 1996).

As infeções por *T. equi* estão geralmente associadas a níveis de parasitémia variáveis entre 1% e 7% (Friedhoff & Soulé, 1996), apesar de nalguns casos mais graves poderem ser atingidas percentagens próximas de 80% (Rothschild, 2013). Pelo contrário, as infeções por *B. caballi* tendem a resultar numa percentagem de eritrócitos infetados variável entre 0,1% e 1%, com valores máximos registados próximos de 10% (de Wall, 1992). Assim, particularmente nas infeções crónicas e subclínicas, caracterizadas por baixos níveis de parasitémia, a probabilidade de identificação dos hemoparasitas por microscopia ótica é bastante reduzida (Brüning, 1996), traduzindo-se numa baixa sensibilidade deste meio de diagnóstico, associada a um elevado número de falsos negativos (Friedhoff & Soulé, 1996).

A realização de testes serológicos para pesquisa de anticorpos permite refletir acerca da exposição ou não do hospedeiro aos hemoparasitas, independentemente da manifestação ou não de sinais clínicos (Tamzali, 2013), apresentando uma sensibilidade superior à microscopia ótica (Wise et al., 2013). No entanto, a utilidade destes testes nas regiões endêmicas tornou-se questionável, uma vez que a maioria dos equinos já sofreu exposição prévia a um ou ambos os agentes, apesar de não manifestarem quaisquer sinais clínicos. Além disso, Allred (2003) considera possível a ocorrência de reações cruzadas entre agentes. Assim, apesar de não serem considerados o método diagnóstico de eleição, os testes serológicos utilizados no diagnóstico da PE são o teste imunoenzimático por competição (cELISA), teste de fixação do complemento (CFT) e teste de imunofluorescência indireta (IFAT) (Tamzali, 2013).

Considerando as limitações das técnicas acima referidas, o teste molecular de reação em cadeia da polimerase em tempo real ou PCR quantitativo é atualmente o teste com maior capacidade de diagnóstico da PE, apresentando sensibilidade e especificidade bastante superiores à microscopia ótica e testes serológicos (Lempereur et al., 2017). Ao contrário de outras modalidades de PCR, nomeadamente *nested* PCR e PCR convencional, que permitem

apenas a detecção e avaliação qualitativa da infecção, o PCR quantitativo permite a determinação objetiva da carga parasitária, tendo sido sugerida utilidade desta técnica no estabelecimento de prognóstico e monitorização da resposta à terapêutica na PE (Bhoora et al., 2010) e noutras doenças infecciosas (Yang & Rothman, 2004).

2.1.11. Tratamento

Nas regiões não endémicas para a PE, o principal objetivo do tratamento de animais infetados consiste na eliminação total dos hemoparasitas e do risco de transmissão da doença. Além disso, este tipo de estratégia também se aplica em casos de equinos positivos que vão ser transportados para regiões livres da doença (Tamzali, 2013). Pelo contrário, nas regiões endémicas para a PE, os objetivos do tratamento médico passam pelo controlo dos sinais clínicos e não pela eliminação total da infecção (Wise et al., 2013), uma vez que a estimulação permanente do sistema imunitário de animais persistentemente infetados apresenta um papel fundamental na proteção dos mesmos. Assim, a manutenção de um baixo nível de parasitemia nestes animais permite um grau de imunidade suficiente que, na ausência de *stress*, imunossupressão e doenças concomitantes, garante proteção contra o desenvolvimento do quadro agudo da doença (Tamzali, 2013).

Atualmente, o fármaco de eleição para o tratamento da PE é o dipropionato de imidocarb (DI), uma vez que apresenta ação contra estadios intraeritrocitários de *T. equi* e *B. caballi* (Tamzali, 2013). Apesar do seu mecanismo de ação não se encontrar totalmente esclarecido, sabe-se que o DI atua diretamente nos hemoparasitas, provocando alterações a nível do núcleo e formação de vacúolos no citoplasma. Além disso, o grupo carbanilida deste fármaco interfere com o processo de glicólise no hospedeiro vertebrado, provocando hipoglicémia. Este efeito compromete o metabolismo dos agentes da PE, uma vez que estes dependem dos níveis plasmáticos de glicose do hospedeiro para a realização de glicólise anaeróbia e consequente obtenção de energia. Este fármaco possui ainda um efeito bloqueador seletivo da replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Direção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV], 2014).

Nas regiões endémicas, o protocolo de tratamento da PE consiste em duas administrações intramusculares de DI numa dose de 2,2 mg/kg, com um intervalo de 24 a 48 horas (Grause et al., 2013). Por outro lado, nas regiões não endémicas, uma vez que é pretendida a eliminação total dos hemoparasitas e da capacidade de transmissão da doença, são recomendadas quatro administrações intramusculares de DI numa dose de 4,4 mg/kg, com intervalos de 72 horas (Meyer, Guthrie & Stevens, 2005; Grause et al., 2013).

Os principais efeitos secundários associados à administração de DI incluem salivação e sudorese excessivas, agitação, sinais de cólica e diarreia (Meyer et al., 2005; Rothschild, 2013). Devido às propriedades tóxicas e à metabolização hepática e renal do DI, a administração deste fármaco pode provocar lesões de necrose nestes órgãos (Adams, 1981; Meyer et al., 2005), sendo fundamental uma monitorização adequada de cavalos medicados com o mesmo (Rothschild, 2013). Burros e mulas são particularmente sensíveis, sendo por isso pouco recomendada a administração de DI nestes animais (Frerichs, Allen & Holbrook, 1973). A falta de informação no que respeita ao tratamento de fêmeas gestantes e poldros neonatos com DI faz com que o uso deste fármaco ainda seja limitado nestes casos (Silvey, 1996; Lewis, Penzhorn & Volkmann, 1999).

A utilização do antibiótico oxitetraciclina revela-se eficaz no tratamento sintomático de infeções por *T. equi*, contrariamente ao que se tem verificado em infeções por *B. caballi*. A dose recomendada é de 5 a 6 mg/kg, administrada diariamente por via endovenosa durante um período de 5 a 7 dias (Zobba et al., 2008).

Duas administrações intramusculares de diminazeno, numa dose variável entre 3,5 e 11 mg/kg, com um intervalo de 24 a 48 horas, também se mostram efetivas no tratamento da PE, existindo evidência da eliminação total dos hemoparasitas com este protocolo (Rashid et al., 2008; Rothschild, 2013). No entanto, a administração intramuscular deste fármaco está frequentemente associada ao aparecimento de lesões musculares (Wise et al., 2013). Outros efeitos secundários da administração de diminazeno incluem letargia e dificuldade respiratória (Rothschild, 2013).

O desenvolvimento dos protocolos atualmente utilizados no tratamento da PE refletiu-se na diminuição do uso de fármacos associados a efeitos secundários mais graves e/ou limitações na eliminação dos hemoparasitas (Wise et al., 2013), nomeadamente a amidocarbalida, euflavina e buparvaquona (Bruning, 1996; Kumar, Gupta, Pal & Dwivedi, 2003).

O tratamento de suporte de animais com quadros mais graves da doença deve ser sempre considerado, passando frequentemente pela administração de fluidoterapia endovenosa, anti-inflamatórios não esteróides (AINES), analgesia e por vezes transfusão de sangue (Wise et al., 2013).

2.1.12. Prevenção

Os princípios da prevenção da PE consistem na adoção de medidas de controlo dos vetores ixodídeos, implementação de restrições à movimentação de cavalos infetados e realização de terapêutica adequada (Tamzali, 2013).

Atualmente, o controlo da PE depende do estatuto das regiões para a doença (Rothschild, 2013). Nas zonas endémicas, uma vez que a imunidade adquirida por cavalos frequentemente expostos aos hemoparasitas constitui o principal mecanismo de defesa contra o desenvolvimento de doença clínica, são contraindicadas quaisquer estratégias que possibilitem a eliminação total agentes da PE, devendo apenas medicar-se animais que exibam um quadro clínico mais grave. Além disso, o controlo de vetores ixodídeos nestas regiões deve basear-se na utilização estratégica de acaricidas (Bruning, 1996), nomeadamente piretróides e lactonas macrocíclicas (Tamzali, 2013), apesar de já terem sido identificados alguns casos de resistência a estes produtos (George, Davey & Pound, 2002).

No caso das regiões não endémicas para a PE, apesar da legislação variar entre países, a maioria dos equinos diagnosticados com a doença são sujeitos a um período de quarentena e tratamento médico até confirmação da eliminação total da infeção, geralmente realizada por cELISA ou qPCR, podendo então ser ou não transportados para outros países, sempre de acordo com as restrições específicas dos mesmos (Wise et al., 2013). Um estudo comparativo entre os dois testes de diagnóstico verificou que cavalos positivos a *T. equi*, após realização de tratamento médico e eliminação total do hemoparasita comprovada por resultados negativos no qPCR e em testes de transmissão, mantinham resultados positivos ao teste de cELISA até 24 meses após eliminação do agente (Ueti et al., 2012).

A prevenção da introdução de vetores ixodídeos infetados nas regiões não endémicas que fazem fronteira com regiões endémicas torna-se bastante difícil, sendo fundamental a desparasitação sistemática dos equinos com produtos acaricidas (nomeadamente ivermectina), vigilância das zonas de maior risco e redução da vegetação (Wise et al., 2013). Atualmente, apesar de não existir nenhuma vacina eficaz contra *T. equi* e *B. caballi* (Sumbria & Singla, 2015), têm sido realizados diversos estudos no que diz respeito a estratégias de imunização contra a PE, nomeadamente através da utilização de antigénios derivados de merozoítos, tendo sido obtidos resultados bastante promissores (Kumar, Malhotra, Dhar & Nichani, 2002). Assim, impera a necessidade de uma maior investigação neste âmbito, considerando a tendência crescente para a globalização da indústria equestre, o impacto económico da PE e a dificuldade que muitas vezes existe no seu controlo.

2.2. Resposta inflamatória aguda

A resposta inflamatória aguda é caracterizada por um conjunto de reações complexas desencadeadas por qualquer estímulo que induza lesão tecidual, nomeadamente trauma, necrose isquêmica, queimaduras, cirurgia, neoplasia, infecções parasitárias, bacterianas ou virais (Gabay & Kushner, 1999). Componente fundamental da imunidade inata (Matijatko et al., 2007), esta resposta inespecífica permite o restabelecimento da homeostasia, contribuindo também para a aquisição de capacidades defensivas e adaptativas do organismo (Crisman, Scarratt & Zimmerman, 2008).

Após lesão tecidual, as células afetadas libertam moléculas sinalizadoras em circulação, nomeadamente espécies reativas de oxigénio e metabolitos do ácido araquidónico, responsáveis pela ativação de macrófagos residentes, neutrófilos e monócitos atraídos para o local e ainda células estromais, maioritariamente fibroblastos (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011). Por sua vez, todas estas células têm como papel principal a libertação de diversos mediadores inflamatórios. Algumas citocinas (Koj, 1996), nomeadamente as interleucinas 1 β e 6 (IL-1 β e IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), produzidas por macrófagos (Eckersall, 2000) e monócitos ativados (Petersen, Nielsen & Heegaard, 2004), são as principais responsáveis pela ativação da cascata de inflamação aguda através da estimulação de diversas células alvo, possuindo uma atividade local, parácrina e endócrina (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011).

Uma vez em circulação, as citocinas pró-inflamatórias estimulam a síntese hepática de proteínas específicas, denominadas proteínas de fase aguda, sendo a variação da sua concentração plasmática dependente da velocidade e intensidade com que são produzidas e libertadas em circulação (Figura 1) (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011).

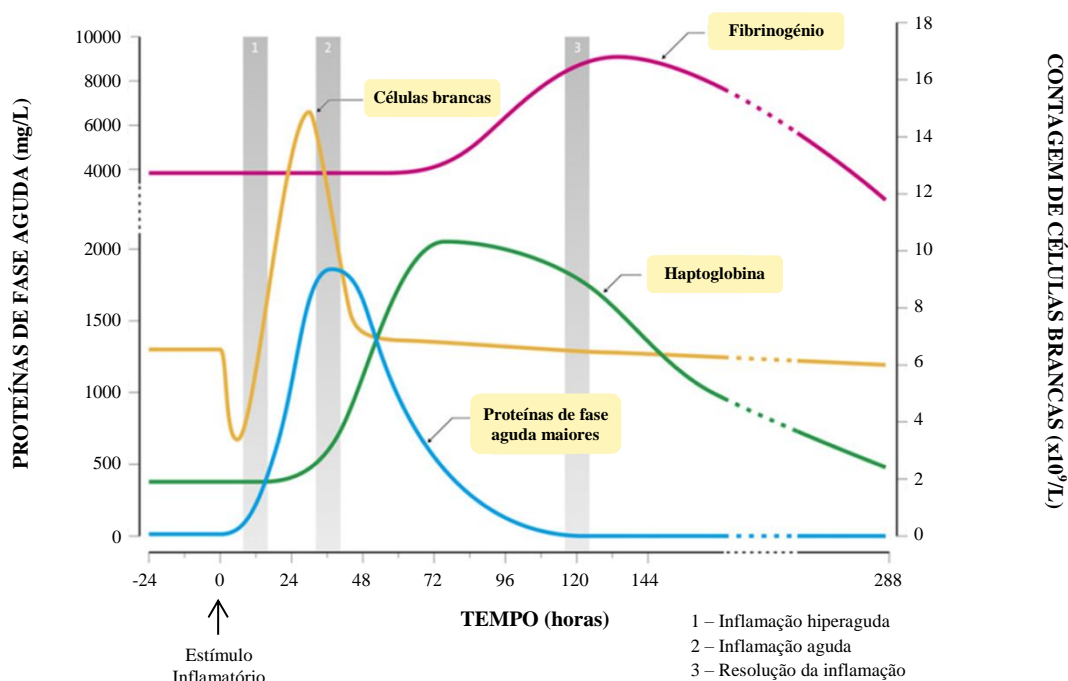
Apesar da síntese das proteínas de fase aguda ocorrer predominantemente a nível hepático e dos seus efeitos serem exercidos maioritariamente a nível sistémico, estudos provaram que alguns tecidos extra-hepáticos podem ser igualmente estimulados para a síntese destas proteínas (McDonald, Larson, Mack & Weber, 2001; Jacobsen et al. 2006). Além disso, Kjelgaard-Hansen & Jacobsen (2011) sugeriram o papel das proteínas de fase aguda não só enquanto moduladoras de inflamação local e sistémica mas também na defesa inata contra microorganismos patogénicos invasores.

As citocinas pró-inflamatórias exercem outros efeitos a nível sistémico, nomeadamente estimulação hipotalâmica e da leucopoiese, ativação e desmarginalização leucocitárias e aumento do catabolismo muscular, justificando o aparecimento de sinais clínicos típicos da inflamação como febre, leucocitose e perda de peso (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011).

2.2.1. Proteínas de fase aguda

São consideradas proteínas de fase aguda todas as proteínas cuja concentração plasmática aumenta ou diminui no mínimo 25% em relação aos valores fisiológicos durante a resposta inflamatória aguda (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011). De acordo com a magnitude dessa variação, estas proteínas podem ser classificadas como positivas (maiores, moderadas e menores) ou negativas (Crisman et al., 2008).

Figura 1 – Perfil cinético das proteínas de fase aguda e da contagem de células brancas durante a resposta inflamatória. Adaptado de Kjelgaard-Hansen & Jacobsen (2011).



As proteínas de fase aguda positivas maiores ocorrem em concentrações plasmáticas mínimas ou não detetáveis em animais saudáveis (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011). No entanto, durante a resposta inflamatória aguda, observa-se em poucas horas um aumento muito significativo destas proteínas, variável entre 10 e 1000 vezes (Tabela 1), sendo o pico de produção atingido entre as 24 e 48 horas após o estímulo inicial (Figura 1) (Jacobsen & Andersen, 2007). Outra característica destas proteínas é o seu curto tempo de semivida, permitindo que os níveis circulantes das mesmas diminuam paralelamente à eliminação do estímulo inflamatório (Petersen et al., 2004). A ocorrência de recidivas ou infecções secundárias tende a provocar uma resposta semelhante destas proteínas (Nolen-Walston, 2015). Atualmente, a proteína de fase aguda positiva maior mais utilizada em clínica de equinos é a amiloide sérica A (Belgrave, Dickey, Arheart & Cray, 2013).

Ao contrário das anteriores, as proteínas de fase aguda positivas menores e moderadas caracterizam-se por níveis plasmáticos detetáveis em animais saudáveis, registando-se aumentos da sua concentração entre 0,5 a 5 vezes e 5 a 10 vezes, respetivamente, durante a resposta a um estímulo inflamatório (Tabela 1) (Jacobsen & Andersen, 2007). A síntese demorada destas proteínas e os longos tempos de semivida que as caracterizam fazem com que a resposta das mesmas ocorra mais lentamente, sendo necessários dias ou mesmo semanas para que se registre o aumento, pico e posterior diminuição dos seus níveis plasmáticos (Figura 1) (Crisman et al., 2008). Relativamente à espécie equina, as principais proteínas de fase aguda menor e moderada são, respetivamente, o fibrinogénio e a haptoglobina (Hultén & Demmers, 2002; Jacobsen & Andersen, 2007).

Tal como ocorre em muitas outras espécies, a albumina é a principal proteína de fase aguda negativa em equinos. Durante a resposta inflamatória aguda, é necessária uma grande mobilização de aminoácidos para que a produção das proteínas de fase aguda possa ocorrer, o que se traduz numa reorganização da síntese proteica. Para tal, a síntese hepática de albumina é inibida e os aminoácidos então disponíveis são principalmente direcionados para a produção de proteínas de fase aguda positivas. Estima-se que durante a resposta inflamatória aguda, 30 a 40% da capacidade de síntese proteica hepática seja utilizada para produção de proteínas da inflamação (Jacobsen & Andersen, 2007).

Tabela 1 – Variação da concentração plasmática das proteínas de fase aguda mais utilizadas em clínica de equinos durante a resposta inflamatória aguda. Adaptado de Jacobsen, Jensen, Frei, Jensen & Thoenes (2005), Jacobsen & Andersen (2007) e Nolen-Walston (2015).

Proteínas de fase aguda	Concentração plasmática normal	Concentração plasmática durante resposta inflamatória
Positivas maiores (aumento da concentração plasmática 10 a 1000 vezes o valor basal)		
Amilóide sérica A	0,5 - 20,0 mg/L	50 - 1500 mg/L (casos mais graves: até 5000 mg/L)
Positivas moderadas (aumento de concentração plasmática 5 a 10 vezes o valor basal)		
Haptoglobina	200 - 1000 mg/L	400 - 2700 mg/L
Positivas menores (aumento de concentração plasmática 0,5 a 5 vezes o valor basal)		
Fibrinogénio	200 - 400 mg/dL	300 - 1100 mg/dL (casos mais graves: até 1500 mg/dL)
Negativas (diminuição da concentração plasmática)		
Albumina	30 g/L	27,5 g/L

2.2.1.1. Amilóide sérica A

A amilóide sérica A (SAA) é uma apolipoproteína de baixo peso molecular (10 a 15 kDa) com propriedades anfipáticas (Christensen, Sørensen, Jacobsen & Kjelgaard-Hansen, 2013), cujo transporte em circulação ocorre através da formação de complexos com lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Jacobsen & Andersen, 2007).

Apesar de o fígado ser o principal responsável pela síntese de SAA em diversas espécies (Nolen-Walston, 2015), vários estudos identificaram a produção extra-hepática de isoformas desta proteína de fase aguda (Upragarin, Landman, Gastra & Gruys, 2005). No caso da espécie equina, identificou-se a produção local de SAA3 ao nível do tecido mamário (McDonald et al., 2001) e líquido sinovial (Jacobsen et al. 2006), sugerindo o efeito mediador desta proteína de fase aguda na resposta inflamatória a nível local.

O mecanismo de ação da SAA na cascata inflamatória ainda não se encontra totalmente estudado. No entanto, sabe-se que esta proteína apresenta um papel importante na regulação da função leucocitária (Badolato et al., 2000), na síntese de outros mediadores inflamatórios e no transporte de lípidos para o foco de inflamação (Lindhorst, Young, Bagshaw, Hyland & Kisilevsky, 1997). Além disso, a SAA estimula a libertação de enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular, nomeadamente colagenases e metaloproteinases (Vallon et al., 2001).

A concentração plasmática de SAA em equinos saudáveis varia entre 0,5 e 20 mg/L (Jacobsen & Andersen, 2007). Éguas gestantes tendem a apresentar níveis plasmáticos de SAA ligeiramente superiores durante o parto, que geralmente normalizam no período de um mês pós-parto (Nunokawa et al., 1993).

Após ativação da cascata inflamatória, a concentração plasmática de SAA aumenta rapidamente, atingindo o pico de produção nas 24 a 48 horas seguintes (Jacobsen & Andersen, 2007). Dado o seu curto tempo de semivida, variável entre 30 minutos e 2 horas (Hoffman & Benditt, 1983), os níveis plasmáticos de SAA começam a diminuir assim que a sua produção deixa de ser estimulada, ou seja, quando se inicia a eliminação do estímulo inflamatório (Belgrave et al., 2013). Desta forma, tendo em conta as particularidades da sua cinética, este mediador inflamatório é atualmente considerado o marcador de resposta inflamatória aguda com maior utilidade em clínica de equinos (Jacobsen & Andersen, 2007). Nos últimos anos, foram vários os estudos realizados com o objetivo de avaliar a concentração plasmática máxima de SAA em situações clínicas recorrentes na espécie equina (Tabela 2).

Tabela 2 – Pico de concentração plasmática de SAA em situações clínicas recorrentes na espécie equina. Adaptado de ¹Jacobsen et al., 2006; ² Lavoie-Lamoureux, Leclere, Lemos, Wagner & Lavoie, 2012; ³ Vandenplas, Moore, Barton, Roussel & Cohen, 2005; ⁴ Jacobsen et al., 2005; ⁵ Nolen-Walston, 2015; ⁶ Belgrave et al., 2013 e ⁷ Andersen, Petersen, Ersbøll, Falk-Rønne & Jacobsen, 2012.

Doença/Situação	Pico de Concentração Plasmática de SAA (mg/L)
Artrite séptica	Até 1500 ¹
Síndrome de asma equina	≤ 15 ²
Lesões intestinais estrangulatórias	0,5-60 ³
Enterite	3-500 ³
Orquiectomia	400-700 ⁴
Peritonite e pleuropneumonia bacterianas	3000-5000 ⁵
Pneumonia viral	500-1000 ⁶
Vacinação	30-175 ⁷

A magnitude do aumento da concentração plasmática da SAA relaciona-se diretamente com a intensidade do estímulo inflamatório. Segundo Jacobsen & Andersen (2007), doenças infecciosas, principalmente de etiologia bacteriana, tendem a provocar aumentos exponenciais na concentração de SAA, enquanto que doenças inflamatórias não infecciosas se traduzem em aumentos mais moderados desta proteína (Tabela 2).

O período pós-operatório de cirurgias eletivas sem complicações é caracterizado por um aumento moderado da SAA (Jacobsen et al., 2005), sendo novamente atingidos níveis basais desta proteína em 48 a 72 horas (Nolen-Walston, 2015).

Um estudo realizado com poldros doentes revelou concentrações de SAA próximas de 300 mg/L nos casos de septicemia neonatal e 200 mg/L nos casos de infecção localizada, nomeadamente onfalites (Stoneham, Palmer, Cash & Rosedale, 2001). Por outro lado, poldros com fraqueza de etiologia não infecciosa (parto prematuro, falha na transferência passiva de imunidade, síndrome de má adaptação neonatal, isoeritrolise neonatal e retenção de mecônio) apresentaram uma concentração plasmática de SAA normal (Stoneham et al., 2001; Hulten & Demmers, 2002) ou apenas ligeiramente elevada (Chavatte-Palmer, Pepys, Roberts & Rosedale, 1992).

2.2.1.2. Fibrinogénio plasmático

O fibrinogénio (fator I da cascata de coagulação) é uma glicoproteína solúvel com 340 kDa de peso molecular, sintetizada principalmente ao nível dos hepatócitos. Além de possuir um papel fundamental na coagulação sanguínea e na manutenção da hemostase (Weisel, 2005), outras funções biológicas igualmente importantes do fibrinogénio incluem a regulação da resposta inflamatória e reparação tecidual (Davalos & Akassoglou, 2012).

A função pró-inflamatória do fibrinogénio deve-se essencialmente à sua capacidade de ativação de células envolvidas na resposta inflamatória através da interação com recetores específicos, nomeadamente as integrinas CD11b/CD18 (Adams, Passino, Sachs, Nuriel & Akassoglou, 2004), expressas à superfície de monócitos e macrófagos. Consequentemente, esta interação resulta na produção local de citocinas inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α (Davalos & Akassoglou, 2012), desgranulação, fagocitose e produção de anticorpos (Crisman et al., 2008).

A concentração plasmática fisiológica do fibrinogénio varia entre 200 e 400 mg/dL na espécie equina (Crisman et al., 2008). Durante a resposta inflamatória aguda, o aumento dos níveis plasmáticos desta proteína ocorre lentamente, podendo ser detetado a partir das 24 horas após o estímulo inicial. Contrariamente ao que se observa para a SAA, a magnitude do aumento da concentração de fibrinogénio varia entre 0,5 e 5 vezes em relação ao valor basal, com o pico a ocorrer nas 72 a 144 horas seguintes ao início da resposta inflamatória (Alen & Kold, 1988).

O tempo de semivida do fibrinogénio varia entre 3 e 5 dias (Weisel, 2005). Assim, uma vez eliminado o estímulo inflamatório, os níveis plasmáticos desta proteína tendem a permanecer elevados durante alguns dias, seguindo-se um período de decréscimo lento, sendo necessários até 11 dias para o restabelecimento dos valores fisiológicos (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011).

Na espécie equina, a realização de diversos estudos para avaliação da resposta das proteínas de fase aguda durante a inflamação resultou na identificação consistente de um aumento tardio dos níveis de fibrinogénio plasmático face ao momento do estímulo inflamatório inicial, nomeadamente em pneumonias infecciosas (Giguère, Hernandez, Gaskin, Miller & Bowman, 2003), artrites induzidas experimentalmente (Andreassen et al., 2017) e no período pós-cirúrgico de orquiectomias (Jacobsen et al., 2005). Assim, apesar de ser considerado uma proteína de fase aguda, valores elevados da concentração plasmática de fibrinogénio não se relacionam necessariamente com o estadio atual da inflamação (Crisman et al., 2008).

2.2.2. Ferro plasmático

O ferro é um elemento fundamental para a maioria dos organismos vivos, participando em múltiplos processos metabólicos, nomeadamente eritropoiese (Silva & Faustino, 2015), transporte de oxigénio, síntese de DNA e transporte de eletrões (Lieu, Heiskala, Peterson & Yang, 2001).

A manutenção da homeostasia do ferro é assegurada pela regulação da sua absorção intestinal ao nível dos enterócitos, degradação em células macrofágicas e armazenamento nos hepatócitos (Silva & Faustino, 2015). Durante a resposta inflamatória aguda, este equilíbrio é afetado por diversos mediadores inflamatórios, nomeadamente pelas citocinas IL-1 β e TNF- α , que induzem a transcrição e aumento da concentração intracelular de ferritina, proteína de ligação ao ferro responsável pelo armazenamento deste elemento em diversos tecidos (Northrop-Clewes, 2008). Em 2004, foi identificado o efeito da IL-6 enquanto estimuladora da síntese de hepcidina, hormona reguladora do metabolismo do ferro (Nemeth et al., 2004). A alteração da concentração destas e outras proteínas reguladoras traduz-se no sequestro de ferro ao nível de células reticuloendoteliais, diminuição da sua absorção a nível intestinal (Andrews, 2004) e consequentemente numa diminuição da sua concentração plasmática (Northrop-Clewes, 2008).

A hipoferrémia associada à inflamação apresenta um papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos, uma vez que a quantidade de ferro disponível para o seu metabolismo se encontra diminuída (Northrop-Clewes, 2008). Além disso, a diminuição do ferro plasmático reduz o seu potencial oxidante e o risco de agravamento de lesões no local da inflamação, uma vez que durante a resposta inflamatória são produzidos radicais livres de oxigénio e as células se encontram mais susceptíveis (Farnaud & Evans, 2003). A manutenção de uma baixa concentração plasmática de ferro em animais com doença crónica ou subclínica pode comprometer a eritropoiese e o tempo de semivida dos eritrócitos, justificando a deteção frequente de anemias não regenerativas nesses casos (Northrop-Clewes, 2008).

A concentração plasmática de ferro em equinos saudáveis varia entre 105 e 277 $\mu\text{g/dL}$. Apesar de ainda não terem sido realizados estudos que avaliem a resposta do ferro em doenças específicas na espécie equina, foram identificadas diminuições significativas dos níveis de ferro em equinos com doença inflamatória local e sistémica, tendo sido também registadas diferenças significativas consoante o estadio da inflamação (agudo, subagudo e crónico) (Borges et al., 2007).

2.3. Biomarcadores de inflamação

A detecção precoce e monitorização da resposta inflamatória é um desafio corrente na prática clínica, uma vez que os sinais cardinais de inflamação (dor, calor, rubor, tumor e perda de função) nem sempre são evidentes (Jacobsen & Andersen, 2007). Muitas vezes, o processo inflamatório segue um curso subclínico, sem manifestação de quaisquer sinais ou sintomas evidentes, podendo comprometer o crescimento e desempenho do animal. Nalguns casos, a não detecção de resposta inflamatória pode conduzir a sequelas graves ou mesmo fatais, nomeadamente falência multiorgânica, sépsis, CID e laminite (Borges et al., 2007).

Nas últimas décadas, realizaram-se diversos estudos com o objetivo de identificar biomarcadores da inflamação, tendo sido comprovado o potencial das proteínas de fase aguda neste sentido, uma vez que a produção destas proteínas durante o processo inflamatório se traduz em alterações significativas das suas concentrações plasmáticas. No entanto, uma vez que a produção das citocinas pró-inflamatórias ocorre independentemente do tipo de estímulo inicial e células lesadas, as proteínas de fase aguda constituem marcadores inespecíficos da inflamação, não devendo por isso ser utilizadas como único meio de diagnóstico (Jacobsen, 2007).

Atualmente, as proteínas de fase aguda mais utilizadas em clínica de equinos são a SAA e o fibrinogénio (Hultén & Demmers, 2002; Borges et al., 2007; Jacobsen & Andersen, 2007). Estes biomarcadores são frequentemente utilizados no diagnóstico de resposta inflamatória aguda, estabelecimento de prognóstico, monitorização da resposta à terapêutica e monitorização de complicações pós-cirúrgicas (Jacobsen, 2007).

2.3.1. Diagnóstico de resposta inflamatória aguda

A utilização da SAA em clínica de equinos tem-se revelado uma ferramenta extremamente útil na avaliação da resposta inflamatória (Nolen-Walston, 2015). Esta proteína de fase aguda apresenta diversas vantagens relativamente ao fibrinogénio, nomeadamente a possibilidade de detecção precoce e estadiamento da inflamação (Jacobsen & Andersen, 2007). O perfil cinético do fibrinogénio durante a inflamação torna-o limitante no que diz respeito à avaliação da resposta inflamatória aguda, sendo por isso considerado um marcador de inflamação aguda tardia (Borges et al., 2007).

Atualmente, o potencial de diagnóstico das proteínas de fase aguda parece ter particular utilidade no que diz respeito à distinção entre doenças infecciosas e não infecciosas (Jacobsen, 2007). Neste contexto, a SAA representa o indicador mais fiável quando comparada com o fibrinogénio e o valor absoluto de leucócitos (Hultén & Demmers, 2002).

Apesar de não terem sido estabelecidos valores *cut off*, alguns estudos indicam que concentrações de SAA entre 50 e 700 mg/L se associam a uma probabilidade reduzida de infecção ativa, não sendo necessária a realização de terapêutica específica na maioria dos casos, uma vez que os valores normais são frequentemente restabelecidos espontaneamente ou apenas com recurso a tratamento de suporte (Nolen-Walston, 2015). A realização de antibioterapia está indicada para valores de SAA superiores a 700 mg/L, sendo no entanto importante esclarecer o tipo de agente infeccioso envolvido (Viner, Mazan, Bedenice, Mapes & Pusterla, 2017). No caso particular de poldros neonatos, foi proposto um valor *cut off* de 100 mg/L, cuja aplicação se traduziu num aumento da eficácia no diagnóstico de sépsis neonatal e consequentemente num aumento do sucesso terapêutico (Stoneham et al., 2001; Giguère, Berghaus & Miller, 2016).

A determinação do ferro plasmático também demonstrou uma elevada sensibilidade na deteção e estadiamento de inflamação local e sistémica em equinos (Borges et al., 2007; Viatte, Gröne, Hentze & Galy, 2009). Ensaaios experimentais registaram uma diminuição significativa nos níveis de ferro 24 horas após indução de resposta inflamatória (Smith & Cipriano, 1987; Auer, Ng, Thompson, Inglis & Seawright, 1989). Num estudo realizado por Borges et al. (2007), cavalos com inflamação sistémica apresentaram uma concentração plasmática de ferro ($64 \pm 45 \mu\text{g/dL}$) inferior ao valor mínimo de referência ($105 \mu\text{g/dL}$) e significativamente inferior a cavalos com inflamação local ($123 \pm 45 \mu\text{g/dL}$) e cavalos saudáveis ($143 \pm 29 \mu\text{g/dL}$). Hooijberg, van der Hoven, Tichy & Schwendenwein (2014) identificaram um aumento da concentração de SAA ($1583 \pm 3312 \text{ mg/L}$) associado à diminuição da concentração plasmática de ferro ($56 \pm 44 \text{ mg/L}$) em cavalos com inflamação sistémica. Além disso, estes autores sugerem que a interpretação conjunta das concentrações de ferro e fibrinogénio se traduz num aumento da sensibilidade de ambos os testes no diagnóstico e avaliação da resposta inflamatória sistémica.

A utilidade das proteínas de fase aguda enquanto biomarcadores de *stress* e doença subclínica na espécie equina ainda não foi comprovada (Jacobsen & Andersen, 2007). No entanto, estudos em bovinos identificaram aumentos ligeiros, embora significativos, na concentração plasmática de SAA em animais sujeitos a níveis elevados de *stress* e doentes subclínicos (Karreman, Wentink & Wensing, 2000; Arthington, Eichert, Kunkle & Martin, 2003).

2.3.2. Estabelecimento de prognóstico

A intensidade e duração da resposta inflamatória dependem do grau de lesão tecidular e da presença ou não de infecção. Desta forma, a magnitude da variação da concentração plasmática das diferentes proteínas de fase aguda poderá ser interpretada como indicadora de prognóstico (Jacobsen, 2007).

Nos últimos anos, realizaram-se diversos estudos com o objetivo de avaliar o potencial da SAA enquanto indicadora de prognóstico em cavalos. Através da indução experimental de artrite, Jacobsen et al. (2006) verificaram que injeções intrarticulares de lipopolissacarídeos em doses crescentes se traduzia em aumentos maiores na variação da concentração plasmática e sinovial de SAA, refletindo não só a intensidade da resposta inflamatória mas também o prognóstico associado a cada uma das situações.

Tendo em conta a elevada incidência de episódios de cólica na espécie equina e a dificuldade na distinção entre cólicas de resolução médica e cirúrgica em muitos dos casos, Pihl et al. (2016) investigaram o potencial da SAA, fibrinogénio e haptoglobina neste âmbito, através da análise da concentração plasmática e peritoneal destas proteínas em 226 cavalos admitidos em hospital devido a episódio de cólica. A avaliação, interpretação e tomada de decisão considerando as alterações ocorridas na concentração plasmática de SAA traduziu-se num aumento de 4% no número de casos corretamente classificados como médicos e cirúrgicos, minimizando o risco de realização desnecessária ou tardia de cirurgia. Noutro estudo recente, cavalos em cólica que apresentavam aumento dos níveis plasmáticos de SAA à admissão foram associados a um maior risco de desenvolvimento de complicações, nomeadamente tromboflebites ou mesmo morte, independentemente da realização de tratamento médico ou cirúrgico (Westerman, Foster, Tornquist & Poulsen, 2016).

Num estudo realizado com poldros neonatos em estado crítico, o aumento dos níveis plasmáticos de fibrinogénio revelou-se a alteração mais consistente e o maior indicador preditivo de mortalidade (Peek et al., 2006). Borges et al. (2007) acrescentaram que a diminuição da concentração plasmática de ferro acompanhada pelo aumento do fibrinogénio plasmático poderá estar associada a um agravamento do prognóstico.

2.3.3. Monitorização da resposta à terapêutica

Na última década, a SAA tornou-se a proteína de fase aguda mais utilizada para monitorização da resposta inflamatória em tempo real na espécie equina, sendo particularmente útil na avaliação da resposta à terapêutica implementada (Jacobsen & Andersen, 2007). Na prática clínica, é frequente a iniciação de antibioterapia previamente à realização ou obtenção dos resultados de testes de sensibilidade a antibióticos (TSA). Nestes casos, a monitorização da SAA poderá representar uma ferramenta eficaz para dedução do efeito do antibiótico eleito e da necessidade ou não de correção da antibioterapia aplicada, uma vez que a eliminação do estímulo inflamatório é rapidamente acompanhada pela diminuição da concentração plasmática desta proteína (Jacobsen, 2007)

Num estudo realizado em poldros diagnosticados com pneumonia por *Rhodococcus equi*, observou-se um aumento consistente dos níveis plasmáticos de SAA e fibrinogénio na avaliação inicial. Durante o período de tratamento destes animais, registou-se uma diminuição progressiva da SAA paralelamente a uma melhoria significativa dos sinais clínicos, enquanto que os níveis de fibrinogénio permaneceram elevados durante várias semanas (Húltén & Demmers, 2002). Artrites sépticas (Jacobsen et al., 2006), infeções respiratórias virais e infeções bacterianas secundárias (Hultén et al., 1999) são exemplos de outras situações clínicas em que se comprovou a utilidade da SAA na monitorização da resposta à terapêutica.

Apesar da avaliação dos níveis plasmáticos de fibrinogénio *per se* não apresentar grande utilidade na monitorização da resposta à terapêutica, dada a resposta demorada desta proteína durante a resposta inflamatória aguda (Daniel et al., 2016), segundo Borges et al. (2007), a interpretação simultânea das alterações na concentração plasmática de fibrinogénio e de ferro poderá apresentar alguma utilidade neste sentido.

2.3.4. Monitorização de complicações pós-cirúrgicas

No período pós-cirúrgico ocorrem frequentemente variações nos níveis circulantes dos biomarcadores da inflamação, uma vez que durante as intervenções cirúrgicas se desencadeia inevitavelmente uma resposta inflamatória (Pollock, Prendergast, Schumacher & Bellenger, 2005). No entanto, o carácter autolimitante da resposta associada a este período traduz-se frequentemente numa normalização da concentração dos biomarcadores poucos dias após a realização do procedimento cirúrgico (Jacobsen, 2007).

Segundo um estudo realizado por Jacobsen et al. (2005), durante o período pós-cirúrgico de animais sujeitos a orquiectomia, a persistência de níveis plasmáticos elevados de SAA a

partir do oitavo dia relacionou-se com o agravamento da resposta inflamatória, principalmente associado à instalação de infecção. Noutro estudo, que avaliou a concentração plasmática de SAA e fibrinogénio em cavalos submetidos a cirurgia de cólica, os animais que desenvolveram complicações entre as 48 e 72 horas após a intervenção apresentaram aumentos significativos da SAA poucas horas após o procedimento cirúrgico. Nestes casos, as principais complicações observadas ocorreram nas 48 horas seguintes à cirurgia, incluindo o desenvolvimento de íleo paralítico, taquicardia sinusal, cólica pós-operatória, febre, diarreia, laminite e morte (Daniel et al., 2016).

Após monitorização dos níveis de SAA, fibrinogénio e ferro durante o período pós-cirúrgico de cavalos submetidos a diferentes tipos de cirurgia, Jacobsen et al. (2009) sugeriram o potencial destes biomarcadores na avaliação do grau de trauma cirúrgico associado a cada procedimento. Cirurgias minimamente invasivas, nomeadamente artroscopias, associaram-se a menores variações da concentração de SAA, fibrinogénio e ferro comparativamente a cirurgias mais invasivas, como laringoplastias e ventriculorredutectomias. A laparotomia exploratória revelou-se o tipo de cirurgia com maiores variações na concentração plasmática destes três marcadores.

2.3.5. Biomarcadores da inflamação na prática clínica

Na clínica de equinos, e particularmente em ambiente hospitalar, é evidente e inquestionável a utilidade dos biomarcadores inflamatórios na avaliação inicial e monitorização de muitos doentes. No entanto, é fundamental compreender que estes parâmetros não deverão ser utilizados em nenhuma circunstância como meio de diagnóstico definitivo, mas sim como um complemento a todos os outros testes de diagnóstico realizados de acordo com a situação em causa, sempre suportados por um exame clínico adequado.

3. Objetivos do estudo

A elevada prevalência da PE em Portugal e o impacto económico da doença na indústria equestre têm-se traduzido num interesse crescente no que diz respeito à deteção de animais positivos à doença. No entanto, o diagnóstico precoce da PE revela-se um desafio comum na prática clínica devido a diversos fatores, nomeadamente a reduzida especificidade dos sinais clínicos manifestados, o elevado número de portadores assintomáticos da doença e a inexistência de testes rápidos que permitam a obtenção de um diagnóstico fiável.

Atualmente, o PCR quantitativo ou qPCR é o teste recomendado para o diagnóstico da PE. No entanto, o acesso a este meio de diagnóstico nem sempre se encontra facilitado, seja pelas condicionantes logísticas associadas ao envio das amostras, os custos envolvidos ou a demora na obtenção de resultados. Estas limitações levam a que frequentemente se inicie terapêutica médica de cavalos suspeitos sem confirmação prévia do diagnóstico. Assim, a identificação de indicadores preditivos da doença permitiria uma ponderação mais objetiva por parte dos clínicos relativamente à necessidade ou não do envio de amostras para realização de diagnóstico molecular.

Os marcadores de inflamação permitem não só a deteção precoce de doenças inflamatórias mas também de doenças associadas a agentes infecciosos. Durante décadas, a proteína de fase aguda mais utilizada na espécie equina foi o fibrinogénio. No entanto, a maior sensibilidade e especificidade da SAA e do ferro plasmático levou a que estes sejam atualmente considerados os marcadores inflamatórios de eleição nesta espécie.

Este projeto pretende a caracterização da resposta inflamatória na PE comparativamente a outras causas de inflamação, através da avaliação de alterações em parâmetros hematológicos e marcadores de inflamação aguda.

Assim, os principais objetivos deste trabalho são:

1. Caracterizar e quantificar alterações no hemograma, proteínas totais, SAA, fibrinogénio e ferro plasmáticos em cavalos com PE;
2. Comparar alterações no hemograma, proteínas totais, SAA, fibrinogénio e ferro plasmáticos entre cavalos com doença clínica e subclínica (portadores assintomáticos);
3. Avaliar o valor diagnóstico do hemograma e marcadores inflamatórios para a PE e outras causas de febre de origem inespecífica;
4. Determinar a carga parasitária em amostras positivas à PE e comparar a sensibilidade da microscopia ótica, considerando os resultados obtidos por diagnóstico molecular.

4. Material e métodos

Todas as amostras submetidas a análise laboratorial foram recolhidas de cavalos que respeitavam um dos seguintes critérios de inclusão, previamente determinados à realização do estudo:

- 1) Cavalo com suspeita de PE devido à deteção de temperatura retal superior a 38,5°C nas últimas 72 horas;
- 2) Cavalo assintomático com suspeita de PE por exposição aos vetores naturais em zonas de elevada prevalência da doença, com posterior confirmação de infeção por qPCR.

Assim, foram incluídos 27 cavalos neste estudo, 19 dos quais respeitavam o primeiro critério de inclusão e 8 o segundo.

4.1. Recolha e envio das amostras

Foi requerido aos veterinários referentes o envio de amostras de sangue venoso colhido a partir da veia jugular de cavalos que respektassem um dos critérios de inclusão acima mencionados. Além do envio de sangue em tubo de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), foi também solicitado o envio de uma amostra de sangue em tubo de heparina.

Todas as amostras recebidas pelo SCUE FMV-UL se encontravam devidamente acondicionadas e conservadas a uma temperatura próxima de 4°C, tendo sido devidamente processadas num período não superior a 72 horas posteriormente à recolha. Todos os cavalos foram testados para *Theileria equi* e *Babesia caballi* no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular do CIISA FMV-UL. Além disso, para cada amostra recebida foi ainda realizada uma análise hematológica e determinação dos valores de proteínas totais, SAA, fibrinogénio e ferro plasmáticos.

Todas as amostras enviadas para o SCUE FMV-UL seguiram acompanhadas de um questionário devidamente preenchido, disponibilizado aos veterinários referentes previamente à realização do estudo, permitindo a obtenção de informação mais detalhada acerca da história do animal em causa (Anexo 1).

4.2. Diagnóstico molecular

4.2.1. Extração de DNA total

A extração do DNA foi realizada a partir de 200 µL de sangue em EDTA. Para realização deste procedimento recorreu-se ao *kit DNeasy® Blood & Tissue* da *QIAGEN*, seguindo-se todas as etapas e instruções citadas no manual de utilização do mesmo.

Inicialmente, aos 200 µL de sangue foram adicionados 20 µL de proteinase K e 180 µL de tampão AL, seguindo-se uma homogeneização no *vortex* e incubação a 56°C durante 15 minutos.

Uma vez terminado o período de incubação, adicionaram-se 200 µL de etanol a 100% à solução, posteriormente homogeneizada no *vortex*, promovendo-se a precipitação do DNA. De seguida, toda a solução (600 µL) foi transferida para uma coluna com um filtro de sílica, previamente colocada num tubo coletor de 2 ml. Seguiu-se um passo de centrifugação a 13000g durante 1 minuto, com posterior eliminação de todo o volume filtrado para o tubo coletor.

Após colocação da coluna num novo tubo coletor de 2 ml, procedeu-se à lavagem do DNA retido no filtro com o tampão AW1, aplicando-se novamente um passo de centrifugação idêntico ao previamente descrito, com posterior eliminação do filtrado. Os procedimentos de lavagem e centrifugação foram novamente repetidos, tendo sido utilizado o tampão de lavagem AW2.

Finalmente, procedeu-se à eluição do DNA retido no filtro de sílica com 200 µL de tampão AE, centrifugando-se o conteúdo da coluna para um microtubo de 1,5 ml.

Todas as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria no *Nanodrop™ 2000c* da *Thermo Scientific* e posteriormente armazenadas a -20°C até à realização do diagnóstico molecular.

4.2.2. PCR quantitativo

O PCR quantitativo (qPCR), atualmente considerado o teste com maior capacidade de diagnóstico de infeções por *T. equi* e *B. caballi*, baseia-se na utilização de um sistema de deteção de fluorescência que permite a quantificação dos produtos amplificados durante a reação (Kim et al., 2008).

Numa reação de qPCR, os *primers* e sonda utilizados apresentam temperaturas de ligação (*annealing*) distintas, sendo pré-estabelecida uma temperatura de ligação da sonda no mínimo 10°C superior à dos *primers* (Thornton & Basu, 2011). Assim, durante a diminuição da temperatura que ocorre após a desnaturação do DNA a 95°C (Kim et al., 2008), a sonda é

a primeira a ligar-se à sua sequência complementar, seguida da ligação dos *primers* (que delimitam o produto a amplificar) assim que seja atingida a temperatura de *annealing* adequada, neste caso pré-definida para 60°C (Thornton & Basu, 2011).

A sonda utilizada numa reação de qPCR apresenta uma marcação na sua extremidade 5' com um fluoróforo *reporter* responsável pela emissão de fluorescência, e na extremidade 3' com um fluoróforo *quencher* responsável pela inibição da emissão de fluorescência pelo *reporter*. Este efeito inibitório é apenas e somente mantido devido à proximidade física existente entre os dois marcadores (Kim et al., 2008).

Após ligação dos *primers* às respectivas sequências complementares, inicia-se a reação de polimerização pela DNA polimerase, ocorrendo degradação da sonda por hidrólise. O consequente afastamento entre o *reporter* e o *quencher* dá início à emissão de fluorescência pelo *reporter*, sendo esta detetada pelo sistema. Assim, a intensidade da fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de produtos de PCR amplificados durante a reação (Thornton & Basu, 2011).

Neste projeto, o diagnóstico molecular através da técnica de qPCR foi realizado com recurso ao sistema *TaqMan*[®]. Os *primers* e sonda utilizados para deteção de *T. equi* (Tabela 3) permitiram a amplificação de uma região específica do gene 18S rRNA do hemoparasita, com um comprimento total de 81 pares de bases (Kim et al., 2008). Pelo contrário, foi utilizado um sistema de deteção inespecífico para *B. caballi*, uma vez que este permite não só a deteção deste agente mas também de outros do género *Babesia* spp. A região alvo do par de *primers* e sonda utilizados também está incluída no gene 18S rRNA de *B. caballi*, com um comprimento total de 97 pares de bases, tendo este sistema de deteção sido previamente desenvolvido pelo Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da FMV-UL. Com base nas sequências nucleotídicas do gene 18S rRNA de *Babesia* spp., as sequências dos *primers* e sonda utilizados foram calculadas com recurso ao programa *Primer Designing Tool* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Tabela 3).

Tabela 3 – Sequências nucleotídicas dos *primers* e sondas utilizados nas reações de qPCR para detecção de *T. equi* e *Babesia* spp. Adaptado de ¹Kim et al., 2008 e ²*Primer Designing Tool*, NCBI.

Agente	Reagente	Sequência 5'-3'
<i>Theileria equi</i> ¹	<i>Primer forward</i>	GCGGTGTTTCGGTGATTCATA
	<i>Primer reverse</i>	TGATAGGTCAGAACTTGAATGATACATC
	Sonda (FAM/NONE)	AAATTAGCGAATCGCATGGCTT
<i>Babesia</i> spp. ²	<i>Primer forward</i>	ACCCATCAGCTTGACGGTAGGGT
	<i>Primer reverse</i>	AGCCGTCTCTCAGGCTCCCT
	Sonda (JOE/TAMRA)	ACCGAGGCAGCAACGGGTAACGGGGA

O protocolo de qPCR aplicado para detecção de *T. equi* e *Babesia* spp. foi equivalente. Considerando um volume final de reação de 20 µL, foram utilizados em todos os ensaios 2 µL de DNA *template*, *primers* a 0,9 µM para *T. equi* e 0,3 µM para *Babesia* spp. e sondas a 0,25 µM para ambos os agentes. Foi ainda utilizada a *mix SensifastTM Probe Hi-ROX* da *Bioline*, que consiste num reagente com concentrações otimizadas de tampão de reação, estimuladores da reação de polimerização e DNA polimerase de atividade mediada por anticorpos específicos a altas temperaturas.

Paralelamente a cada reação foram sempre realizados dois controlos negativos e um controlo positivo. Os controlos positivos consistiram em plasmídeos recombinantes previamente desenvolvidos no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular a partir de amostras positivas a cada um dos agentes, com recurso aos *kits* de clonagem *CloneJETTM PCR* da *Thermo Scientific* para *T. equi* e *pGEM[®]-T* da *Promega* para *B. caballi*.

Todas as reações foram amplificadas no termociclador *Step One PlusTM* da *Applied Biosystems*, tendo sido aplicado um protocolo de amplificação adaptado ao proposto por Kim et al. (2008): 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 45 ciclos de 10 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Para todas as amostras positivas, procedeu-se ao registo do respetivo *cycle threshold* (CT), correspondente ao número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência supere o limiar de detecção pré-estabelecido pelo *software* do termociclador.

4.2.3. *Nested PCR*

Com o objetivo de validar o resultado obtido no qPCR, todas as amostras positivas foram submetidas a um *nested PCR* (nPCR), técnica alternativa ao PCR convencional, com maior sensibilidade e especificidade, devido aos dois ciclos de amplificação necessários. Uma desvantagem associada a esta técnica é a maior probabilidade de contaminações, que ao ocorrerem invalidam todo o ensaio.

Contrariamente ao realizado para o qPCR, em cada reação de nPCR foram utilizados os mesmos pares de *primers* para a detecção de *T. equi* e *B. caballi*, uma vez que as sequências complementares dos *primers* selecionados foram previamente identificadas em ambos os hemoparasitas. As sequências nucleotídicas destes *primers* foram desenhadas por Jefferies, Ryan & Irwin (2007), permitindo a amplificação de uma região do gene 18S rRNA para ambos os hemoparasitas (Tabela 4).

Tabela 4 – Sequências nucleotídicas dos *primers* (*outer* e *inner*) utilizados no nPCR para detecção de *T. equi* e *B. caballi*. Adaptado de Jefferies, Ryan & Irwin, 2007.

Ciclo de amplificação	<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'
1ª reação	<i>Outer forward</i>	GGCTCATTACAACAGTTATAG
	<i>Outer reverse</i>	CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC
2ª reação	<i>Inner forward</i>	CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC
	<i>Inner reverse</i>	GGACTACGACGGTATCTGATCG

O protocolo de nPCR aplicado para detecção de *T. equi* e *B. caballi* foi equivalente. O par de *primers outer*, utilizado no primeiro ciclo, permitiu a amplificação de uma região específica de DNA com aproximadamente 930pb, utilizada como *template* no segundo ciclo, no qual o par de *primers inner* delimitou e permitiu a amplificação de uma sequência de DNA mais curta do que a primeira, com cerca de 800pb.

Para um volume final de reação de 25 µL, utilizou-se o volume de 2 µL e 2,5 µL de DNA *template* no primeiro e segundo ciclos de amplificação, respetivamente. Todos os *primers* foram utilizados a uma concentração de 0,4 µM. Foi ainda utilizada a *mix AccustartTM II PCR SuperMix 500RXN* duas vezes concentrada, reagente com concentrações otimizadas de MgCl₂, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), tampão de reação, DNA polimerase *AccuStart Taq* ligada a anticorpos *AccuStart Taq* e estabilizadores de reação.

Igualmente ao que foi feito no qPCR, foram sempre realizados dois controlos negativos e um controlo positivo por amostra submetida ao nPCR.

Todas as reações foram corridas no termociclador *DOPPIO*[®] da *VWR*, tendo sido utilizado o mesmo protocolo amplificação nos dois ciclos, adaptado de Jefferies et al. (2007): 3 minutos a 94°C, 1 minuto a 58°C, 2 minutos a 72°C, 45 ciclos de amplificação (30 segundos a 94°C, 20 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C) e 7 minutos a 72°C.

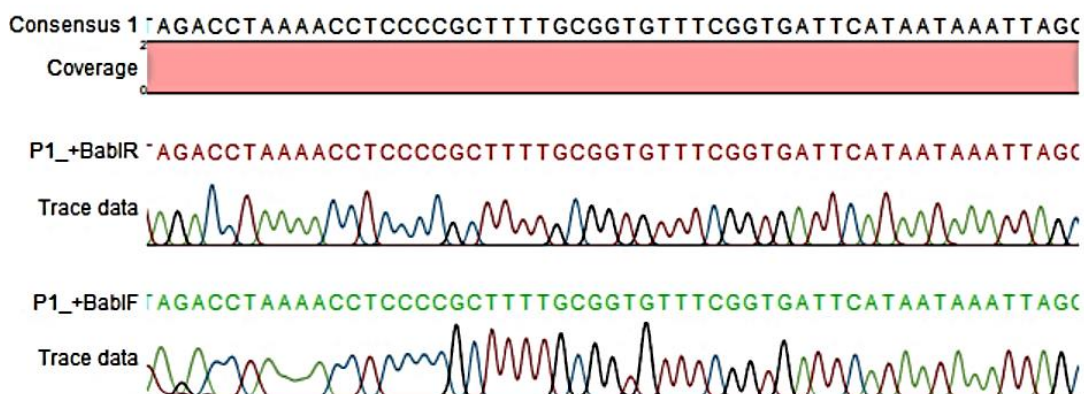
Os produtos de PCR amplificados foram submetidos a uma eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, na presença de GelRed a 1:20000 (*Biotium*), com aplicação de uma corrente constante de 90V durante aproximadamente uma hora e trinta minutos. Para identificação das bandas de interesse no gel, foi também incluído na corrida de eletroforese o marcador de pesos moleculares *NZYDNA Ladder V* da *NZYTech*.

Uma vez terminada a eletroforese, colocou-se o gel no transiluminador de radiação ultravioleta *ImageMaster* para visualização adequada, procedendo-se ao registo da imagem obtida em formato digital.

Após confirmação da presença de bandas de interesse, todas as amostras positivas foram devidamente purificadas com recurso ao *kit DNA Clean and Concentrator*TM da *Zymoresearch*, quantificadas por espectrofotometria no *Nanodrop*TM 2000c e enviadas para sequenciação, realizada pela *STABVida* Portugal.

Todos os cromatogramas resultantes da sequenciação foram processados no programa informático *CLC Main Workbench* da *QIAGEN Bioinformatics*. Posteriormente à avaliação das sequências *forward* e *reverse* e correção das zonas de conflito existentes entre as mesmas, foram obtidas as sequências consenso para cada amostra sequenciada (Figura 2).

Figura 2 – Sequência consenso obtida após alinhamento das sequências delimitadas pelos *primers reverse* e *forward* para uma amostra positiva a *T. equi* no qPCR e posteriormente submetida a nPCR. Original.



Para confirmação da especificidade da sequenciação, cada sequência consenso foi submetida na plataforma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do *National Institute of Health* (NIH), disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, que permitiu a identificação do agente detetado pelo nPCR. Desta forma, foi possível a comparação objetiva entre os resultados obtidos no qPCR e nPCR.

4.2.4. Determinação da parasitémia

A primeira etapa deste processo consistiu na realização de diluições seriadas de base 10 (10^{-2} a 10^{-7}) dos plasmídeos recombinantes utilizados como controlos positivos de *T. equi* e *B. caballi*. Além disso, utilizando o valor da concentração de cada solução de DNA plasmídico recombinante, previamente determinado por espectrofotometria no *NanodropTM 2000c*, procedeu-se ao cálculo do número de moléculas de DNA existentes nas mesmas e nas respetivas diluições, através da seguinte fórmula:

$$nMol = \frac{[]}{PM \text{ pb} \times \text{pb recombinante}} \times N_A$$

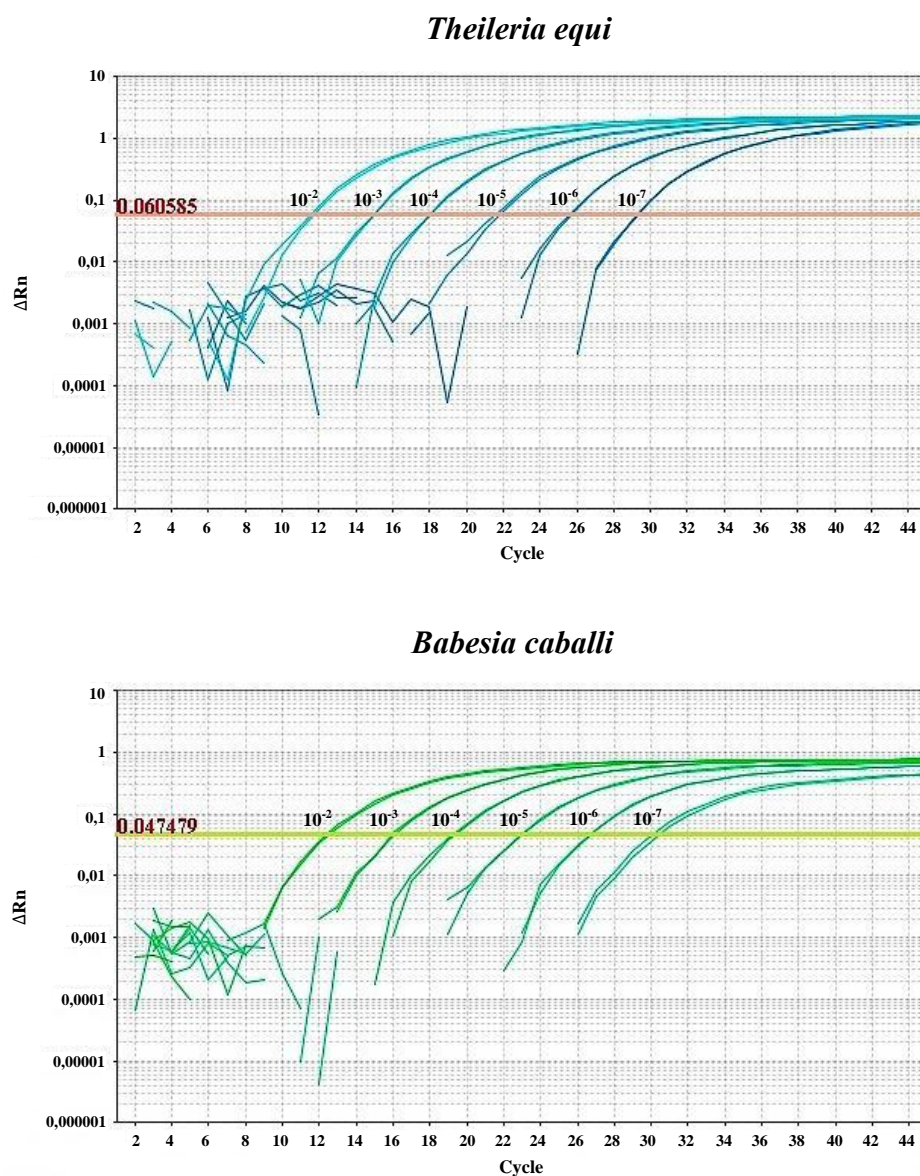
em que *nMol* corresponde ao número de moléculas de DNA por μL de solução, *[]* corresponde à concentração da solução de DNA plasmídico recombinante expressa em $\text{g}/\mu\text{L}$, *PM pb* corresponde à estimativa do peso molecular de um par de bases, ou seja, 660 g/mol , *pb recombinante* corresponde ao número total de pares de bases do plasmídeo recombinante utilizado (Tabela 5) e N_A corresponde à constante de Avogadro, ou seja, $6,022 \times 10^{23}$.

Tabela 5 – Fórmulas dos plasmídeos recombinantes utilizados como controlos positivos de *T. equi* e *B. caballi*. e na determinação da carga parasitária de cada uma das amostras positivas. Adaptado de Jefferies et al., 2007.

Agente	Dimensão do plasmídeo linear	Produto clonado (<i>insert</i>)	Dimensão do plasmídeo recombinante
<i>Theileria equi</i>	3000pb (<i>pGEM</i>)	792pb	3792pb
<i>Babesia caballi</i>	2974pb (<i>pJET</i>)	813pb	3787pb

Todas as diluições foram submetidas a um qPCR e corridas em duplicado no termociclador *Step One PlusTM* (Figura 3), tendo sido aplicado o protocolo previamente descrito para as amostras sujeitas a este método de diagnóstico molecular.

Figura 3 – Curvas de qPCR obtidas para cada uma das diluições de plasmídeo recombinante realizadas para *T. equi* e *B. caballi*, respetivamente. Original.



Com base no CT de cada uma das diluições e no número de moléculas de DNA presente nas mesmas, o *software* do sistema utilizado criou, para cada um dos hemoparasitas, uma reta padrão cuja equação permitiu o cálculo da carga parasitária em função do CT (Figura 4):

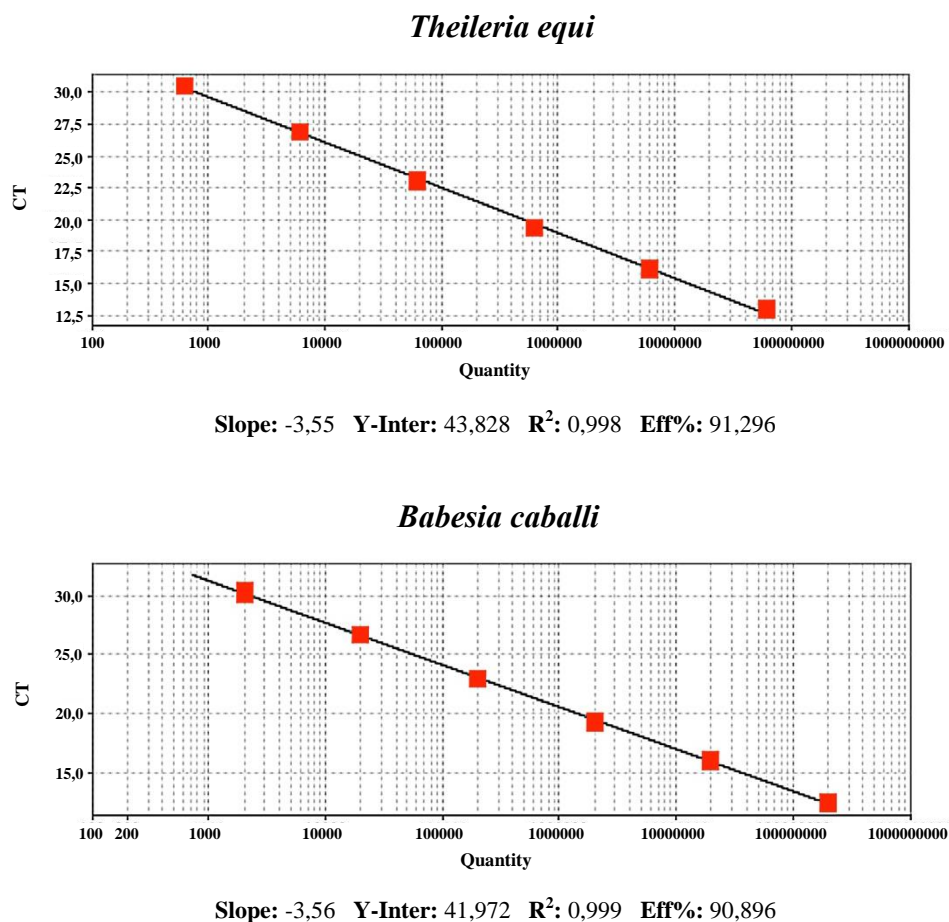
$$\text{Para } T. \text{ equi: } x_T = \frac{CT-43,828}{-3,55}$$

$$\text{Para } B. \text{ caballi: } x_B = \frac{CT-41,972}{-3,56}$$

em que x_T e x_B correspondem ao número de moléculas de DNA do respetivo hemoparasita existentes nos 2 μL de solução de DNA *template* utilizados por reação, equivalente ao número de parasitas existentes em 2 μL de sangue.

Com recurso ao *software* do sistema, foi ainda determinada a eficiência do protocolo de qPCR utilizado na deteção e quantificação da carga parasitária em infeções por *T. equi* e *B. caballi* (Figura 4).

Figura 4 – Retas padrão para determinação da carga parasitária de *T. equi* e *B. caballi*, respetivamente, em função do CT. Original.



4.3. Análise hematológica

As amostras de sangue em EDTA foram devidamente processadas no Laboratório de Análises Clínicas Professor M. Braço Forte, com recurso ao aparelho *ProCyte DxTM* da *IDEXX*. Os intervalos de referência dos parâmetros avaliados no hemograma encontram-se mencionados no Anexo 2.

Foi também realizado um esfregaço sanguíneo de cada uma das amostras, seguindo-se a sua observação microscópica na zona de monocamada com uma ampliação de 400 e 1000 vezes, tendo sido registadas todas as alterações consideradas relevantes.

4.4. SAA

Para doseamento desta proteína de fase aguda foi utilizado sangue em EDTA, tendo-se recorrido ao *kit StableLab[®]*, que consiste num teste rápido de diagnóstico por imunocromatografia, com exatidão e precisão estimadas de 95,6% e 98,6%, respetivamente, para concentrações de SAA variáveis entre 50 e 2000 mg/L (Viner et al., 2017). Este teste foi realizado com base nas instruções citadas no manual de utilização do *kit*.

O intervalo de referência considerado para a concentração sérica de SAA foi de 0,5 a 20 mg/L (Jacobsen & Andersen, 2007).

4.5. Proteínas totais e fibrinogénio plasmático

Para determinação do fibrinogénio plasmático recorreu-se ao método de precipitação pelo calor (de Souza, de Souza, Rodrigues, Júnior & Cordeiro, 2006).

Dois tubos de microhematócrito foram preenchidos por capilaridade com sangue em EDTA até cerca de dois terços da sua capacidade, seguindo-se o encerramento de uma das suas extremidades. Posteriormente, ambas as amostras foram centrifugadas a 12000g durante 5 minutos. Uma vez terminado o programa de centrifugação, colocou-se uma alíquota de plasma de um dos microtubos no prisma de um refratómetro de *Goldberg* e procedeu-se à leitura direta e registo da concentração plasmática das proteínas totais, em g/dL.

O tubo de microhematócrito não utilizado para a determinação das proteínas totais foi colocado em banho maria a 56°C durante 3 minutos e posteriormente recentrifugado a 12000g durante 5 minutos. Estas duas etapas permitiram, respetivamente, a precipitação e sedimentação do fibrinogénio. Utilizando novamente o refratómetro de *Goldberg*, retirou-se uma alíquota de soro do microtubo e procedeu-se à leitura direta da concentração das proteínas, em g/dL.

A concentração plasmática de fibrinogénio correspondeu à diferença entre os valores da concentração plasmática de proteínas no primeiro e segundo microtubos. O resultado obtido foi convertido para mg/dL.

Os intervalos de referência considerados para as proteínas totais e fibrinogénio plasmático foram, respetivamente, 6,0 a 7,2 g/dL (Jacobsen & Andersen, 2007) e 200 a 400 mg/dL (Crisman et al., 2008).

4.6. Ferro plasmático

Para determinação do ferro plasmático, cada amostra de sangue em tubo de heparina foi centrifugada a 3000g durante 10 minutos, transferindo-se 1,5 ml do plasma obtido para um microtubo, armazenado a -20°C até ao seu processamento.

O doseamento do ferro plasmático foi realizado com recurso ao aparelho *RX daytona+TM* da *RANDOX*. O método aplicado consiste num teste colorimétrico baseado na complexação do ferro com um reagente cromogénico, sendo a intensidade da cor produzida na reação diretamente proporcional à concentração de ferro no plasma.

O intervalo de referência considerado neste estudo para o ferro plasmático foi de 105 a 277 µg/dL (Borges et al., 2007).

4.7. Análise estatística

De acordo com a sintomatologia apresentada e o resultado da análise de qPCR, os cavalos testados foram distribuídos por 3 grupos distintos (PC, NS e SC), representados na Tabela 6.

Tabela 6 – Caracterização dos grupos PC, NS e SC considerados neste estudo. Original.

Grupo	Febre de origem inespecífica	qPCR
PC	Sim	Positivo a <i>T. equi</i> e/ou <i>B. caballi</i>
NS	Sim	Negativo a <i>T. equi</i> e <i>B. caballi</i>
SC	Não	Positivo a <i>T. equi</i> e/ou <i>B. caballi</i>

Legenda: PC – Positivos clínicos; NS – Negativos suspeitos; SC – Subclínicos

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa informático *R*, tendo sido utilizada a *library* “Rcmdr”.

Todos os parâmetros laboratoriais determinados foram devidamente testados para a normalidade com recurso ao teste de *Shapiro-Wilk*. Dos 18 parâmetros avaliados (14 na análise hematológica, proteínas totais, SAA, fibrinogénio e ferro plasmáticos), apenas 9 apresentaram uma distribuição normal (leucócitos, eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, proteínas totais e ferro plasmático). Assim, foram considerados os valores de média (\bar{x}) \pm desvio padrão (σ) para os parâmetros com distribuição normal e valores de mediana (\tilde{x}) + intervalo interquartil (IQR) para os parâmetros que não seguiram uma distribuição normal.

A avaliação de diferenças significativas entre os grupos PC-NS, PC-SC e NS-SC para todos os parâmetros em estudo foi realizada com recurso ao teste estatístico *one-way ANOVA*, considerando um nível de significância com $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Caracterização e descrição clínica da amostra

Nenhum dos cavalos incluídos neste estudo havia sido previamente submetido a qualquer teste de diagnóstico da PE.

A média de idades dos 27 animais incluídos no estudo foi de 8,3 anos. Relativamente ao género, 11 (41%) eram machos inteiros, 7 (26%) machos castrados, 3 (11%) fêmeas gestantes e 6 (22%) fêmeas não gestantes. Procedeu-se ainda ao registo da raça, com 18 cavalos (67%) a pertencerem à raça Puro Sangue Lusitano e 4 (15%) à raça Cruzado Português. As raças Frísia, *Koninklijk Warmbloed Paardenstamboek Nederland* (KWPN), *Zangersheide*, Trotador Francês e Sela Francês foram individualmente representadas apenas por um exemplar.

Relativamente à distribuição geográfica, todos os animais se encontravam, no momento da colheita das amostras de sangue, limitados às regiões de Lisboa e Vale do Tejo e Alto Alentejo.

Considerando os 19 cavalos que apresentavam febre de origem inespecífica, registou-se um valor médio para este parâmetro de $39,3 \pm 0,71^{\circ}\text{C}$. Destes, 7 (37%) apresentavam mucosas normais ao exame físico, 7 (37%) mucosas pálidas e 5 (26%) mucosas tendencialmente ictéricas. Além disso, 14 cavalos (74%) exibiam depressão, 12 (63%) anorexia, 5 (26%) fraqueza, 5 (26%) perda de peso e 1 (5%) edema dos membros e distensão articular. Por fim, 4 (21%) destes animais apresentavam sintomatologia compatível com outras doenças, nomeadamente cólica, pleuropneumonia, doença hepática e miosite.

Relativamente aos 8 animais com suspeita de PE por exposição aos vetores naturais da doença em zonas de elevada prevalência da mesma, não foram registadas quaisquer alterações ao exame físico pelos veterinários referentes.

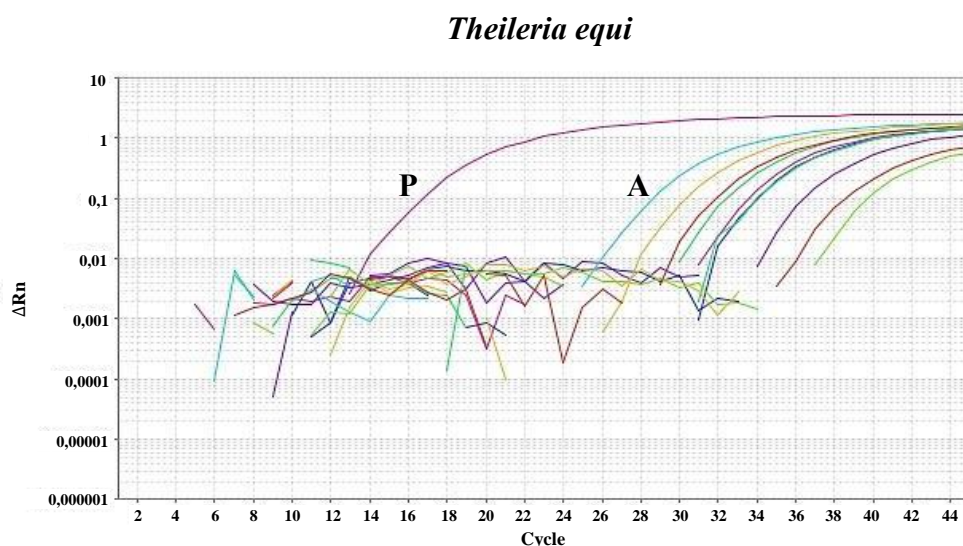
5.2. qPCR e nPCR

Relativamente aos 19 cavalos com febre de origem inespecífica, 7 (37%) foram positivos a *T. equi* e 2 (11%) a *Babesia* spp, representando o grupo PC. Os 10 cavalos com febre e negativos a ambos os agentes foram incluídos no grupo NS.

Foram testados 9 cavalos assintomáticos com suspeita de PE, tendo-se comprovado infeção por *T. equi* em 8 (89%) animais, representantes do grupo SC. De modo a respeitar os critérios de inclusão pré-estabelecidos, o cavalo assintomático e negativo a ambos os agentes da PE foi excluído deste estudo.

Considerando os 27 cavalos incluídos neste estudo, 15 (56%) revelaram-se positivas a *T. equi* e 2 (7%) a *Babesia* spp. (Figura 5). Não foi diagnosticada coinfeção em nenhum dos animais testados.

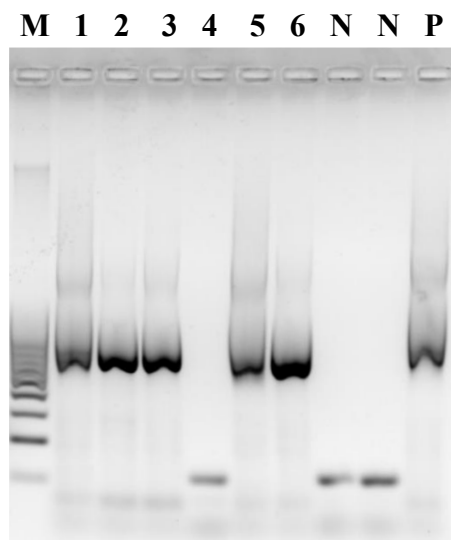
Figura 5 – Curvas de qPCR obtidas para 10 amostras positivas a *T. equi* e para o controlo positivo do respetivo agente. Original.



Legenda: P – Controlo positivo de *T. equi* (plasmídeo recombinante); A – Amostras positivas a *T. equi*

Das 17 amostras positivas no qPCR e posteriormente submetidas a nPCR, foram identificadas bandas de interesse para 15 amostras durante a observação do gel de eletroforese no transiluminador de radiação UV (Figura 6). As 2 amostras que não revelaram essas bandas foram devidamente purificadas e novamente submetidas a um nPCR, que revelou a existência de bandas de interesse para ambas. Assim, procedeu-se à purificação e envio para sequenciação da totalidade das amostras positivas no qPCR.

Figura 6 – Resultado da observação do gel de eletroforese para 6 amostras positivas a *T. equi* no qPCR e posteriormente submetidas a nPCR. Original.



Legenda: M – Marcador de pesos moleculares (*NZYDNA Ladder V*); 1, 2, 3, 5, 6 – Amostras com bandas de interesse; 4 – Amostra sem banda de interesse posteriormente purificada e submetida a um segundo nPCR; N – Controles negativos; P – Controle positivo de *T. equi* (plasmídeo recombinante)

Após processamento adequado e submissão da sequência consenso na plataforma BLAST do NIH, os resultados da sequenciação confirmaram os resultados obtidos no qPCR para as 17 amostras, ou seja, o agente da PE identificado pela técnica de nPCR (*Theileria equi* ou *Babesia caballi*) correspondeu ao diagnosticado pelo qPCR em 100% dos casos.

5.3. Determinação da parasitêmia e comparação com os resultados da observação microscópica do esfregaço sanguíneo

As equações das retas padrão que permitiram a determinação da carga parasitária nas amostras positivas foram associadas eficiências de 91,3% e 90,9% para *T. equi* e *Babesia* spp., respetivamente.

Não foram detetadas diferenças significativas de parasitêmia entre cavalos com doença clínica (grupo PC) e subclínica (grupo SC). Relativamente ao grupo PC, obteve-se um valor médio de parasitêmia de $9,7 \times 10^3$ parasitas/ μL para *T. equi*, com registo de valores máximo e mínimo de $6,7 \times 10^4$ e $2,8 \times 10^1$ parasitas/ μL , respetivamente. No caso dos 2 animais positivos a *B. caballi*, registaram-se valores de parasitêmia de $1,0 \times 10^4$ e $5,3 \times 10^3$ parasitas/ μL , resultando num valor médio de $7,8 \times 10^3$ parasitas/ μL . Considerando o grupo SC, em que todos os animais foram apenas diagnosticados como sendo positivos a *T. equi*, foi registado

um valor médio de $1,7 \times 10^3$ parasitas/ μL para este agente, com valores máximo e mínimo associados de $9,6 \times 10^3$ e $1,5 \times 10^1$ parasitas/ μL .

Durante a observação microscópica dos esfregaços sanguíneos, apenas foi identificada a forma parasitária de merozoíto de *T. equi*. Além disso, considerando os grupos PC e SC, a observação dos merozoítos ocorreu apenas em 5 (29%) dos 17 esfregaços, cujas amostras apresentavam uma parasitemia igual ou superior a $7,2 \times 10^2$ parasitas/ μL .

Não foram observadas quaisquer formas parasitárias de *T. equi* e *B. caballi* em esfregaços sanguíneos de animais diagnosticados como negativos à PE pelas técnicas de diagnóstico molecular utilizadas.

5.4. Sinais clínicos

Dos 9 cavalos pertencentes ao grupo PC, todos os que apresentaram sinais clínicos para além de febre foram diagnosticados como positivos a *T. equi*, não tendo sido registada qualquer alteração ao exame físico dos 2 animais positivos a *B. caballi* para além da presença de temperatura retal superior a $38,5^\circ\text{C}$. Dos 7 cavalos positivos a *T. equi*, 3 (33,3%) apresentaram mucosas tendencialmente ictéricas e apenas 1 (11,1%) mucosas pálidas. Além disso, 6 cavalos (66,7%) revelaram depressão, 4 (44,4%) anorexia, 4 (44,4%) perda de peso e 3 (33,3%) fraqueza.

Relativamente aos 4 cavalos que apresentaram, para além de febre, sintomatologia compatível com outras doenças (cólica, pleuropneumonia, doença hepática e miosite), apenas o cavalo com suspeita de doença hepática foi negativo à PE.

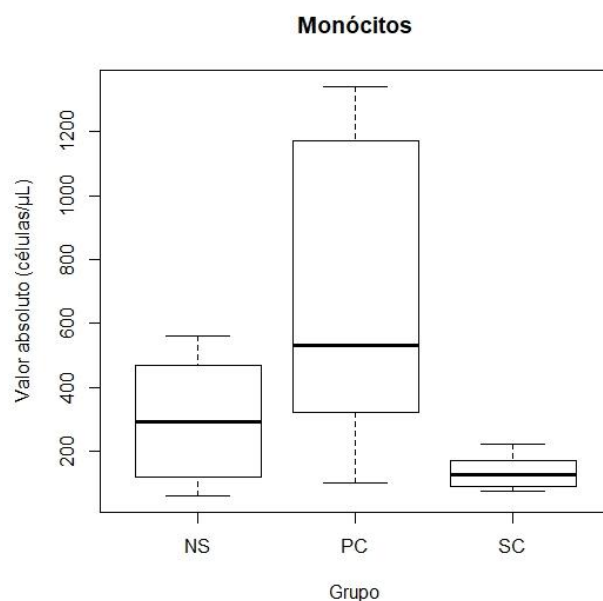
5.5. Hemograma

Relativamente ao eritrograma, apenas foram identificadas diferenças significativas no parâmetro HCM entre os grupos PC ($15,8 \pm 0,6$ pg) e NS ($17,0 \pm 1,0$ pg), com um valor p associado de 0,0256.

No leucograma, apenas o valor absoluto de monócitos revelou diferenças significativas tanto entre os grupos PC ($530,0 + 849,0$ células/ μL) e NS ($293,0 + 295,8$ células/ μL) como entre os grupos PC e SC ($126,5 + 77,3$ células/ μL), registando-se valores de p de 0,0293 e 0,0025, respetivamente (Figura 7).

Verificou-se ainda que 75% dos animais portadores assintomáticos de PE (grupo SC), apresentava neutrofilia ligeira ($4317,0 + 1195,8$ células/ μL) sem desvio à esquerda, registando-se para este grupo um valor absoluto máximo de neutrófilos segmentados de 7313 células/ μL e mínimo de 3780 células/ μL .

Figura 7 – Valor absoluto de monócitos (expresso em células/ μ L de sangue) em função do grupo em estudo. Original.



No Anexo 3 encontram-se representados os valores de $\bar{x} \pm \sigma$ e $\tilde{x} + \text{IQR}$ registados para os respetivos parâmetros avaliados no hemograma.

5.6. Esfregaço sanguíneo

Relativamente ao grupo PC, foram observadas formas de merozoíto de *T. equi* em 2 (22,2%) dos 9 esfregaços sanguíneos. Ainda neste grupo, observou-se anisocitose e policromasia em 3 (33,3%) esfregaços. Registou-se também a presença de corpos de *Howell-Jolly* em 5 (55,5%) esfregaços. Por fim, ainda que raros, foram observados dacriócitos e equinócitos em 2 (22,2%) esfregaços de animais pertencentes a este grupo.

Nos esfregaços sanguíneos dos cavalos do grupo NS, a única alteração digna de registo consistiu na presença de anisocitose numa das lâminas observadas.

No grupo SC, foram identificadas formas de merozoíto de *T. equi* em 3 (37,5%) dos 8 esfregaços. Além disso, observaram-se corpos de *Howell-Jolly* em 3 (37,5%) esfregaços e hipersegmentação de neutrófilos apenas em 1 (13%) esfregaço.

A observação de *rouleaux*, isto é, agregados de eritrócitos, foi transversal aos três grupos, tendo-se identificado este tipo de formas em 6 lâminas do grupo PC (66,6%), 4 do grupo NS (40%) e 5 do grupo SC (62,5%).

5.7. Proteínas totais, SAA, fibrinogénio e ferro plasmáticos

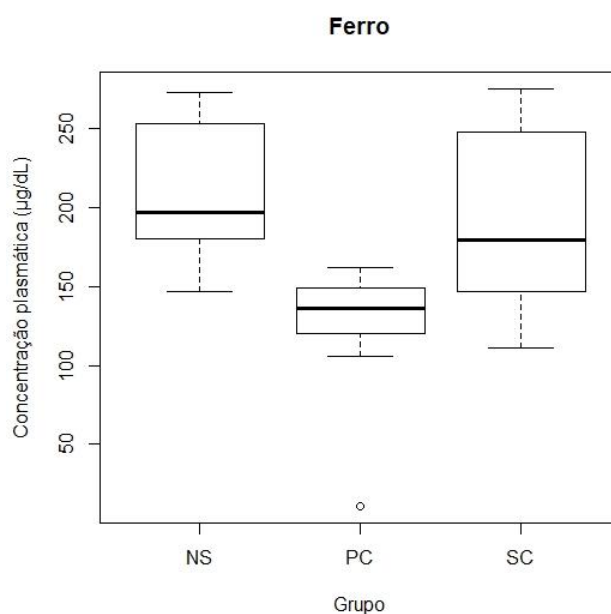
Relativamente às proteínas totais e fibrinogénio, não se observaram diferenças significativas entre os três grupos em estudo. No entanto, foram identificadas diferenças significativas na SAA entre os grupos PC ($901,0 \pm 366,0$ mg/L) e SC ($12,0 \pm 5,3$ mg/L), com um valor de p associado de aproximadamente 0,002 (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de $\bar{x} \pm \sigma$ e $\tilde{x} + \text{IQR}$ registados para os respetivos parâmetros de proteínas totais, ferro plasmático, SAA e fibrinogénio plasmático. Original.

Parâmetro	Grupo PC	Grupo NS	Grupo SC
Proteínas totais (g/dL)	$7,3 \pm 0,5$	$7,1 \pm 0,6$	$7,5 \pm 0,2$
Ferro plasmático ($\mu\text{g/dL}$)	$123,3 \pm 42,8$	$210,4 \pm 42,5$	$191,9 \pm 55,3$
SAA (mg/L)	$901,0 \pm 366,0$	$130,0 \pm 666,6$	$12,0 \pm 5,3$
Fibrinogénio plasmático (mg/dL)	$5,0 \pm 4,0$	$4,0 \pm 2,9$	$4,0 \pm 0,5$

Registaram-se ainda diferenças significativas para o ferro plasmático (Figura 8) entre os grupos PC ($123,3 \pm 42,8$ $\mu\text{g/dL}$) e NS ($210,4 \pm 42,5$ $\mu\text{g/dL}$) e PC e SC ($191,9 \pm 55,3$ $\mu\text{g/dL}$), com valores de p de 0,0023 e 0,0235, respetivamente (Tabela 7).

Figura 8 – Concentração plasmática de ferro (expressa em $\mu\text{g/dL}$) em função do grupo em estudo. Original.



6. Discussão

6.1. Caracterização da amostra

6.1.1. Prevalência dos agentes da PE em cavalos com febre de origem inespecífica e portadores assintomáticos da doença

Considerando os 19 cavalos com febre de origem inespecífica (grupos PC e NS), registou-se uma prevalência de infeções por *T. equi* de 56%, confirmando o estatuto endémico das regiões de Lisboa e Vale do Tejo e Alto Alentejo para a PE, já reportado por outros estudos (Malta, 2001; Rego, 2008). Relativamente a *B. caballi*, obteve-se uma prevalência de infeções por este hemoparasita de apenas 7%, percentagem semelhante às obtidas por dois estudos que avaliaram a prevalência do agente numa exploração coudélica do Ribatejo (Rego, 2008) e no norte de Portugal (Ribeiro, Cardoso, Maia, Coutinho & Cotovio, 2013).

A discrepância entre os valores de prevalência dos agentes da PE registados neste estudo, considerando tanto animais com doença clínica como subclínica (estes últimos 100% positivos a *T. equi*), justifica-se pela possibilidade de eliminação espontânea de *B. caballi* pelo sistema imunitário (Rothschild, 2013), pela maior dificuldade no tratamento médico de infeções por *T. equi* (Schwint et al., 2009; Ueti et al., 2012) e ainda pela possibilidade de transmissão vertical do último hemoparasita (Rego, 2008).

6.1.2. Sinais clínicos

Considerando o grupo PC, e tendo em conta a sintomatologia apresentada pelos cavalos pertencentes a este grupo, concluiu-se que os animais positivos a *T. equi* manifestaram um quadro subagudo de PE e os positivos a *B. caballi* um quadro crónico da doença. Relativamente à coloração das membranas mucosas avaliada durante o exame físico, a presença de mucosas tendencialmente ictéricas revelou-se a alteração mais frequente neste grupo, com uma especificidade de 80% enquanto indicador de doença clínica, face à especificidade de 40% calculada para a apresentação de mucosas pálidas. Num estudo realizado por Zobba et al. (2008), a presença de mucosas ictéricas revelou-se o segundo sinal clínico mais observado em cavalos positivos a *T. equi*. Neste mesmo estudo, a apresentação de mucosas pálidas ocorreu num número reduzido de cavalos positivos a *T. equi* e não foi identificada em quaisquer animais positivos a *B. caballi*.

No que diz respeito aos restantes sinais clínicos observados nos cavalos do grupo PC, a elevada incidência de depressão (66,7%), seguida de anorexia e perda de peso (44,4%) e

fraqueza (33,3%) confirmam a inespecificidade da apresentação clínica da PE, previamente evidenciada por outros estudos (Zobba et al, 2008; Laus et al., 2015).

Relativamente aos 3 cavalos que apresentavam sintomatologia de cólica, pleuropneumonia e miosite, respetivamente, e que foram diagnosticados como positivos a *T. equi*, pode ser considerada a hipótese destas doenças, por comprometimento do sistema imunitário, terem sido responsáveis pela reagudização da infeção, que se mantinha até então em fase de latência (Oladosu & Olufemi, 1992).

Considerando o grupo NS, a inespecificidade dos sinais clínicos observados pelos veterinários referentes associa-se a uma lista de diagnósticos diferenciais muito vasta e consequentemente à necessidade de realização de exames complementares adicionais que permitissem um diagnóstico definitivo. Relativamente ao único cavalo que apresentou edema dos membros e distensão articular, uma vez excluída a hipótese de se tratar de PE, e pelo facto da história pregressa do animal indicar a permanência do mesmo a campo durante todo o ano, uma das principais doenças a considerar na lista de diagnósticos diferenciais seria doença de Lyme, cujo agente etiológico é *Borrelia burgdorferi*, bactéria igualmente transmitida por vetores ixodídeos (van der Kolk, 2016). No entanto, não foi realizado qualquer tipo de teste de diagnóstico para a doença.

6.2. Técnica de qPCR na deteção e quantificação de *T. equi* e *B. caballi*

Uma vez que todas as amostras diagnosticadas como positivas à PE por qPCR foram confirmadas por nPCR, comprovou-se a elevada sensibilidade e especificidade desta técnica quantitativa de diagnóstico molecular tanto na deteção de doença clínica como subclínica, (Kim et al., 2008; Bhoora et al., 2010; Jaffer et al., 2010).

As equações das retas padrão que permitiram a determinação da carga parasitária de *T. equi* e *B. caballi*, associadas a eficiências de 91,3% e 90,9%, respetivamente, revelaram-se uma ferramenta útil principalmente para efeitos de comparação. No entanto, num estudo realizado por Bhoora et al. (2010), foram obtidos valores de eficiência de 99,7% e 97,8% para a quantificação dos mesmos agentes, o que sugere a necessidade de aperfeiçoamento das equações das retas padrão obtidas no presente estudo, nomeadamente através da realização de um maior número de diluições das soluções de plasmídeos recombinantes.

Relativamente à carga parasitária de *T. equi*, a diferença entre os valores médios registados para os grupos PC e SC não se traduziu numa diferença significativa que permitisse o estabelecimento de um valor *cut-off* de diferenciação entre doença clínica e subclínica com base na parasitémia. Além disso, a similitude dos valores médios de parasitémia obtidos para

os dois grupos poderá sugerir uma resposta competente do sistema imunitário dos cavalos do grupo PC face à infecção (Cunha et al., 2006), que apesar de não impedir a manifestação de alguns sinais clínicos apresenta um papel importante na atenuação do quadro clínico apresentado.

A detecção de apenas 2 cavalos positivos a *B. caballi* no grupo PC justificou que neste estudo não fossem avaliadas diferenças de valores de parasitêmia para este agente entre os grupos PC e SC nem entre cavalos positivos a *B. caballi* e cavalos positivos a *T. equi*.

6.3. Caracterização das alterações hematológicas na piroplasmose equina

6.3.1. Hemograma

Relativamente ao eritrograma, apesar de terem sido identificadas diferenças significativas no valor médio de HCM entre os grupos PC e NS, este parâmetro encontrava-se dentro do intervalo de referência em ambos os grupos. Além disso, o HCM por si só não apresenta grande utilidade, sendo preferível a interpretação conjunta do VCM e CHCM, uma vez que com estes parâmetros é possível relacionar a concentração de hemoglobina nos eritrócitos com o volume dos mesmos (Gavazza, Delgadillo, Gugliucci, Pasquini & Lubas, 2002). No entanto, não ocorreram diferenças significativas nestes dois parâmetros entre grupos.

No leucograma, as diferenças significativas registadas no valor absoluto de monócitos entre o grupo PC (530,0 + 849,0 células/ μ L) e os grupos NS (293,0 + 295,8 células/ μ L) e SC (126,5 + 77,3 células/ μ L), ainda que todos os valores se encontrassem dentro do intervalo de referência, motiva a teoria de que na PE clínica poderá ocorrer uma maior migração destas células (produzidas na medula óssea) para a circulação sistémica. A diferenciação de monócitos em células dendríticas e macrófagos constitui um importante mecanismo de defesa do organismo face a um estímulo inflamatório, nomeadamente agentes infecciosos (Rudolph, Correa, Zurita & Manley, 1975; Cowell & Tyler, 2002). Além disso, segundo Cowell & Tyler (2002), o aumento do valor absoluto de monócitos é frequentemente observado em cavalos com doenças associadas ao fenómeno de hemólise.

Apesar dos cavalos do grupo NS apresentarem febre de origem inespecífica, sinal cardinal de resposta inflamatória, a mediana do valor absoluto de monócitos neste grupo e a comparação com o grupo PC sugere que estes animais, negativos à PE, apresentavam uma resposta inflamatória menos intensa e com menor necessidade de mobilização destas células para controlo do foco de inflamação.

O número de neutrófilos em circulação reflete o balanço entre as exigências a nível tecidular e a resposta dada pela medula óssea face às mesmas (Jefcoat, Wagner & Robinson, 2003).

Assim, a neutrofilia ligeira sem desvio à esquerda registada em 75% dos animais do grupo SC sugere que doentes subclínicos, apesar de não apresentarem alterações evidentes ao exame físico, tendem a manter uma resposta inflamatória residual. Atualmente, não existem estudos na espécie equina que avaliem alterações hematológicas associadas a doença subclínica.

6.3.2. Esfregaço sanguíneo

A presença de *rouleaux* revela-se um achado frequente durante a observação de esfregaços sanguíneos de cavalos saudáveis, relacionando-se com a rápida sedimentação destas células na espécie equina (Cowell & Tyler, 2002).

A identificação de merozoítos de *T. equi* apenas nos esfregaços sanguíneos de cavalos com uma carga parasitária igual ou superior a $7,2 \times 10^2$ parasitas/ μ L de sangue sugere a reduzida sensibilidade desta técnica para o diagnóstico da PE (Lempereur et al., 2017). No entanto, as diversas alterações e formas celulares anormais identificadas durante a observação microscópica dos esfregaços comprovam a importância da sua realização durante a avaliação de cavalos com suspeita da doença.

Relativamente ao grupo PC, a anisocitose e policromasia registadas em 33,3% dos esfregaços constituem uma das principais características das anemias regenerativas (Cowell & Tyler, 2002). No entanto, nenhum destes animais possuía um hematócrito inferior a 24%. Assim, estas alterações poderão ser indicadoras de uma resposta regenerativa precoce da medula óssea face à presença dos hemoparasitas, mesmo antes de se ter instalado o quadro de anemia.

A anisocitose observada num dos esfregaços sanguíneos do grupo NS foi classificada como sendo de baixo grau (Harvey, 2001). No entanto, para uma melhor avaliação desta alteração, dever-se-ia recorrer ao parâmetro objetivo que avalia a variação de volume dos eritrócitos, o *red blood cell distribution width* (RDW) (Adewoyin & Nwogoh, 2014), não calculado neste estudo.

A identificação de corpos de *Howell-Jolly* (inclusões de DNA remanescente nos eritrócitos) nos grupos PC e SC não apresenta necessariamente um significado clínico, uma vez que estas formas podem ser identificadas em esfregaços sanguíneos de cavalos saudáveis (Cowell & Tyler, 2002). No entanto, a sua observação ocorre maioritariamente nas anemias regenerativas (Cowell & Tyler, 2002), caracterizadas por uma resposta ativa da medula óssea no processo de eritropoiese. Estas inclusões podem ainda associar-se a uma diminuição do sequestro de eritrócitos a nível esplénico (Adewoyin & Nwogoh, 2014).

Os dacriócitos, identificados em 22,2% dos esfregaços do grupo PC, consistem em eritrócitos em forma de lágrima com palidez central evidente, sendo um dos principais diagnósticos diferenciais desta alteração morfológica a hipoferrémia (Adewoyin & Nwogoh, 2014). Apesar do valor médio da concentração plasmática de ferro nos animais deste grupo se encontrar dentro dos valores de referência, o grupo PC apresentou o valor mais baixo entre os três grupos em estudo, o que poderá justificar o facto de apenas terem sido observados dacriócitos em esfregaços sanguíneos deste grupo.

A hipersegmentação de neutrófilos, identificada num esfregaço sanguíneo do grupo SC, ocorre quando se regista uma percentagem de neutrófilos circulantes com mais de 5 fragmentos nucleares igual ou superior a 5% (Adewoyin & Nwogoh, 2014). Apesar de existirem poucos estudos em equinos que reportem esta alteração, os principais diagnósticos diferenciais associados à hipersegmentação de neutrófilos são a administração de corticosteróides, *stress* crónico, doenças mieloproliferativas, doença hepática (Ramaiah, Harvey, Giguère, Franklin & Crawford, 2003), doença renal, anemia megaloblástica, hipoferrémia (Adewoyin & Nwogoh, 2014) e etiologia idiopática (Prasse, George & Whitlock, 1981).

6.4. Caracterização das alterações em biomarcadores de resposta inflamatória na piroplasmose equina

6.4.1. SAA e ferro plasmático

Atualmente, a SAA é a proteína de fase aguda mais utilizada em clínica de equinos, não só pela elevada sensibilidade enquanto marcador de resposta inflamatória (Pollock, 2017) mas também pela sua utilidade no processo de diagnóstico, estabelecimento de prognóstico e monitorização da resposta à terapêutica (Pugliese, Gaiti, & Boiti, 2012). Neste estudo, foram observadas diferenças significativas nos níveis de SAA entre os grupos PC ($901,0 \pm 366,0$ mg/L) e SC ($12,0 \pm 5,3$ mg/L), sugerindo que animais com doença clínica tendem a apresentar um grau de resposta inflamatória invariavelmente superior a animais com doença subclínica, cuja mediana dos valores de SAA se encontrava dentro do intervalo de referência. Segundo Walston (2015), que reuniu resultados de vários estudos, animais saudáveis tendem a apresentar níveis de SAA próximos de 0 mg/L, sugerindo que valores superiores, ainda que dentro do intervalo de referência, poderão relacionar-se com a presença de condições subclínicas, embora sejam necessários mais estudos neste âmbito.

Apesar de não terem sido registadas diferenças significativas para a SAA entre os grupos PC e NS ($130,0 \pm 666,6$ mg/L), a mediana dos valores obtida para o segundo grupo sugere uma

resposta inflamatória de intensidade inferior à do grupo PC, com uma baixa probabilidade ser necessária a implementação de terapêutica específica na maioria dos casos, devendo o tratamento de suporte ser considerado de acordo com os achados ao exame físico e testes complementares realizados. Contrariamente, o valor mediano de SAA obtido para o grupo PC, superior a 700 mg/L, propõe a necessidade de implementação de tratamento médico dirigido contra os agentes da PE (Húltén et al., 2010; Ludwig et al., 2016; Viner et al., 2017), nunca descartando a hipótese de existência de uma patologia concomitante sem antes realizar uma avaliação adequada do animal.

No presente estudo, apesar da concentração plasmática de ferro se encontrar dentro do intervalo de referência em todos os grupos, registou-se um valor médio significativamente inferior no grupo PC ($123,3 \pm 42,8 \mu\text{g/dL}$) em relação aos grupos NS ($210,4 \pm 42,5 \mu\text{g/dL}$) e SC ($191,9 \pm 55,3 \mu\text{g/dL}$). Estes resultados concordam parcialmente com os obtidos num estudo semelhante de Bottari et al. (2016), em que a concentração plasmática de ferro em cães com quadro agudo de erliquiose (doença provocada por uma bactéria hemotrófica transmitida por vetores ixodídeos), além de significativamente inferior à do grupo de controlo (representado por animais saudáveis), se encontrava abaixo do limite inferior de referência considerado para este parâmetro. O facto de os animais do grupo PC terem apresentado apenas um quadro subagudo de PE pode justificar as diferenças significativas da concentração plasmática de ferro entre este e o grupo NS, sem que no entanto tenha ocorrido um desvio dos valores de ferro do grupo PC em relação ao intervalo de referência.

Segundo Ganz & Nemeth (2015), a regulação sistémica da concentração plasmática de ferro durante a resposta inflamatória deve-se principalmente ao aumento da produção de hepcidina. Este aumento traduz-se na diminuição da absorção intestinal de ferro, aumento da síntese hepática de proteínas de ligação e aumento do sequestro deste elemento por macrófagos, constituindo um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, uma vez que o ferro é essencial para a sobrevivência da maioria dos microorganismos, incluindo os agentes da PE (Kappmeyer et al. 2012). Assim, os resultados do presente estudo sugerem que o ferro plasmático poderá ser útil na distinção de cavalos com piroplasmose e cavalos com doença inflamatória de outra etiologia, não devendo no entanto ser excluída, com base nos resultados obtidos, a hipótese de alguns cavalos do grupo NS serem portadores de outra doença de etiologia infecciosa.

A diferença significativa entre os resultados obtidos para o ferro plasmático entre os grupos PC e SC apoia a teoria de que animais com doença clínica, por apresentarem infeção ativa e consequentemente uma resposta inflamatória mais intensa, comprovada pelos valores de

SAA, tendem a demonstrar níveis plasmáticos de ferro inferiores quando comparados com cavalos cuja doença se encontra em estado de latência. Atualmente, não existem quaisquer estudos em equinos que avaliem a concentração plasmática de ferro em estádios subclínicos de doença. No entanto, Bottari et al. (2016) também avaliaram alterações do metabolismo deste elemento em cães portadores assintomáticos de erliquiose. Os resultados desse estudo revelaram que animais com doença subclínica exibiam um aumento significativo dos níveis plasmáticos de ferritina e transferrina, proteínas de ligação ao ferro induzidas pela hepcidina, sem alteração significativa da concentração plasmática de ferro, sugerindo que a ativação deste mecanismo de defesa também ocorre em doentes subclínicos, embora sem repercussão nos níveis plasmáticos de ferro.

6.4.2. Proteínas totais e fibrinogénio plasmático

Não foram identificadas diferenças significativas nas proteínas totais e fibrinogénio plasmático entre os grupos em estudo, sugerindo a pouca relevância destes parâmetros na avaliação de cavalos com suspeita de piroplasmose.

Dada a ordem de grandeza da concentração de SAA (expressa em mg/L) ser tão reduzida em relação à da concentração de proteínas totais (expressas em g/dL, ou seja, 10^4 mg/L), as alterações na concentração da proteína de fase aguda não foram suficientes para se refletirem num aumento significativo do valor das proteínas totais em nenhum dos grupos.

Relativamente ao fibrinogénio plasmático, registaram-se valores de mediana dentro do intervalo de referência e sem diferenças significativas entre grupos. Estes resultados podem relacionar-se com o facto de o fibrinogénio ser uma proteína de fase aguda de reação lenta durante a resposta inflamatória (Borges et al., 2007) e de as variações na sua concentração plasmática não serem tão evidentes como no caso da SAA (Gruys, Toussaint, Niewold & Koopmans, 2005). Assim, será plausível considerar que tanto os animais do grupo PC como NS se encontrariam numa fase inicial de resposta inflamatória, sem repercussões ao nível da concentração plasmática de fibrinogénio. Relativamente ao grupo SC, uma vez que a infeção se encontrava numa fase de latência, caracterizada por níveis basais de SAA, os resultados obtidos para o fibrinogénio apoiaram novamente a teoria de que estes animais apresentariam uma resposta inflamatória residual, justificando a ausência de alterações nos valores obtidos para esta proteína.

6.5. Limitações do estudo e perspectivas futuras

A principal limitação deste estudo advém do número relativamente reduzido de amostras analisadas, que se deveu sobretudo ao facto da recolha das mesmas ter ocorrido entre o final do outono e início da primavera, estações do ano pouco propícias à ocorrência de infeção primária, considerando a baixa incidência de vetores ixodídeos neste período. No estudo realizado por Zooba et al. (2008), que avaliou a distribuição de casos de PE durante o ano em Itália, registou-se uma maior incidência de doença clínica entre maio e julho.

Como perspectivas futuras, seria interessante começar por aumentar o número de animais testados. Além disso, uma vez que os cavalos incluídos neste estudo representam uma área geográfica muito limitada, dever-se-ia apostar numa maior divulgação de estudos desta natureza com o objetivo de abranger um maior número de regiões do país. Análises igualmente pertinentes seriam a avaliação da intensidade da sintomatologia apresentada em função da carga parasitária e também a retestagem de animais positivos com doença clínica após realização de tratamento médico, de modo a avaliar a evolução da parasitemia.

Apesar deste estudo sugerir a utilidade de alguns parâmetros hematológicos e marcadores inflamatórios na caracterização da PE, seria interessante explorar o potencial de outros parâmetros neste sentido. Considerando os resultados de estudos realizados em cães infetados com *Erlichia canis* (Bottari et al., 2016; Escribano et al., 2017), a avaliação dos níveis plasmáticos de albumina e hepcidina na PE deverá ser considerada em estudos futuros. Adicionalmente, poder-se-ia introduzir um quarto grupo de animais saudáveis (grupo S) caracterizado por animais sem febre e negativos a ambos os agentes da PE. Assim, as comparações realizadas entre os grupos PC-NS, PC-SC e NS-SC poderiam ser estendidas, com particular interesse na avaliação de diferenças entre o grupo de animais portadores assintomáticos e animais do grupo S, de modo a tentar identificar valores *cut-off* que associassem animais com determinadas alterações no hemograma e/ou marcadores inflamatórios a uma maior probabilidade de serem portadores assintomáticos de PE.

A identificação de cavalos portadores assintomáticos daria suporte à tomada de decisões em diversas situações frequentes na prática clínica, nomeadamente optar pela realização de tratamento médico previamente à realização de cirurgias eletivas, venda ou participação em competições no estrangeiro e na seleção de éguas reprodutoras. Além disso, sendo a oxitetraciclina um dos fármacos mais utilizados atualmente no tratamento da doença e considerando a problemática das resistências aos antibióticos na atualidade, o diagnóstico de cavalos com PE poderá contribuir para a prevenção do tratamento inadequado de animais que apesar de apresentarem sinais compatíveis com a doença são negativos à mesma.

7. Conclusão

Nas últimas décadas, a PE tem apresentado um impacto crescente na indústria equestre, condicionando a venda e participação de cavalos em competições desportivas em diversos países, que ao implementarem medidas de restrição criteriosas passaram a assegurar a manutenção de um estatuto indemne para a doença.

Neste estudo, os cavalos com PE clínica positivos a *T. equi* apresentaram um quadro subagudo da doença, caracterizado por sinais clínicos inespecíficos como febre, depressão, perda de apetite, perda de peso, fraqueza e alteração da coloração das mucosas. Por outro lado, os 2 cavalos positivos a *B. caballi* manifestaram um quadro crónico da doença, registando-se apenas a presença de febre.

Relativamente aos testes de diagnóstico, concluiu-se que o PCR quantitativo representa uma excelente ferramenta para a deteção de cavalos com PE clínica e subclínica, tendo sido associado a uma especificidade de 100%. Além disso, a determinação objetiva da parasitémia apresenta um grande potencial para estudos futuros, nomeadamente para um maior esclarecimento da relação existente entre os sinais clínicos, tratamento médico e a carga parasitária. Por outro lado, a realização de esfregaços sanguíneos, apesar de não dispensável devido às alterações morfológicas possíveis de identificar, representa um meio de diagnóstico pouco sensível no que diz respeito ao diagnóstico de animais com PE.

A alteração hematológica mais significativa consistiu no aumento do número de monócitos em cavalos com doença clínica comparativamente a animais com febre de origem inespecífica negativos à PE e cavalos portadores assintomáticos da doença. Além disso, no leucograma dos animais com doença subclínica foi observada neutrofilia em 75% dos casos. Verificou-se um aumento significativo da concentração de amilóide sérica A em cavalos com doença clínica relativamente a animais subclínicos. A concentração plasmática de ferro também apresentou diferenças significativas entre cavalos positivos à PE com doença clínica, cavalos com febre de origem inespecífica de outra etiologia e cavalos portadores assintomáticos da doença.

Com este estudo, foi possível identificar algumas alterações laboratoriais relevantes na caracterização da PE em diferentes estadios da doença, que comprovaram a utilidade da realização deste tipo de exames complementares na avaliação de animais suspeitos. No futuro, é necessária a realização de projetos semelhantes que complementem a informação até agora recolhida, de modo a que a PE, doença endémica em Portugal, seja cada vez mais valorizada pelos médicos veterinários.

8. Bibliografia

- Adams, L.G. (1981). Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. *Research in Veterinary Science*, 31(1), 54–61.
- Adams, R.A., Passino, M., Sachs, B.D., Nuriel, T. & Akassoglou, K. (2004). Fibrin mechanisms and functions in nervous system pathology. *Molecular Interventions*, 4(3), 163–176.
- Adewoyin, A.S. & Nwogoh, B. (2014). Peripheral blood film – a review. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*, 12(2), 71–79.
- Allen, B.V. & Kold, S.E. (1988). Fibrinogen response to surgical tissue trauma in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 20(6), 441–443.
- Allen, P.C., Frerichs, W.M. & Holbrook, A.A. (1975). Experimental acute *Babesia caballi* infection. I. Red blood cell dynamics. *Experimental Parasitology*, 37(1), 67–77.
- Allen, P.C., Frerichs, W.M. & Holbrook, A.A. (1975). Experimental acute *Babesia caballi* infection. II. Response of platelets and fibrinogen. *Experimental Parasitology*, 37(3), 373–379.
- Allred, D.R. (2003). Babesiosis: persistence in the face of adversity. *Trends in Parasitology*, 19(2), 51–55.
- Allsopp, M.T.E.P., Lewis, B.D. & Penzhorn, B.L. (2007). Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Veterinary Parasitology*, 148(2), 130–136.
- Alward, A., Corriher, C.A., Barton, M.H., Sellon, D.C., Blikslager, A.T. & Jones, S.L. (2006). Red maple (*Acer rubrum*) leaf toxicosis in horses: a retrospective study of 32 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(5), 1197–1201.
- Ambawat, H.K., Malhotra, D.V., Kumar, S. & Dhar, S. (1999). Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. *Veterinary Parasitology*, 85(4), 319–324.
- Andersen, S.A., Petersen, H.H., Ersbøll, A.K., Falk-Rønne, J. & Jacobsen, S. (2012). Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses. *The Veterinary Journal*, 191(2), 199–202.
- Andreassen, S.M., Vinther, A.M.L., Nielsen, S.S., Andersen, P.H., Tnibar, A., Kristensen, A.T. & Jacobsen, S. (2017). Changes in concentrations of haemostatic and inflammatory biomarkers in synovial fluid after intra-articular injection of lipopolysaccharide in horses. *BMC Veterinary Research*, 13, 182–198.
- Andrews, N.C. (2004). Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(9), 1251–1253.

- Arthington, J.D., Eichert, S.D., Kunkle, W.E. & Martin, F.G. (2003). Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *Journal of Animal Science*, 81(5), 1120–1125.
- Auer, D.E., Ng, J.C., Thompson, H.L., Inglis, S. & Seawright, A.A. (1989). Acute phase response in horses: changes in plasma cation concentrations after localised tissue injury. *The Veterinary Record*, 124(10), 235–239.
- Badolato, R., Wang, J.M., Stornello, S.L., Ponzi, A.N., Duse, M. & Musso, T. (2000). Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-*Candida* activity. *Journal of Leucocyte Biology*, 67(3), 381–386.
- Belgrave, R.L., Dickey, M.M., Arheart, K.L. & Cray, C. (2013). Assessment of serum amyloid A testing of horses and its clinical application in a specialized equine practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(1), 113–119.
- Bhoora, R., Quan, M., Franssen, L., Butler, C.M., van der Kolk, J.H., Guthrie, A.J., Zweggarth, E., Jongejan, F. & Collins, N.E. (2010). Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. *Veterinary Parasitology*, 168(3-4), 201–211.
- Borges, A.S., Divers, T.J., Stokol, T. & Mohammed, O.H. (2007). Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(3), 489–494.
- Bottari, N.B., Crivellenti, L.Z., Borin-Crivellenti, S., Oliveira, J.R., Coelho, S.B., Contin, C.M., Tatsch, E., Moresco, R.N., Santana, A.E., Tonin, A.A., Tinucci-Costa, M. & da Silva, A.S. (2016). Iron metabolism and oxidative profile of dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*: acute and subclinical disease. *Microbial pathogenesis*, 92(1), 26–29.
- Brüning, A. (1996). Equine piroplasmiasis an update on diagnosis, treatment and prevention. *The British Veterinary Journal*, 152(2), 139–151.
- Chavatte-Palmer, P., Pepys, M.B., Roberts, B. & Rosedale, P.D. (1992). Measurement of serum amyloid A protein (SAA), as an aid to the differential diagnosis of infection in newborn foals. *Equine Infectious Diseases*, VI, 33–38.
- Chhabra, S., Ranjan, R., Uppal, S.K & Singla, L.D. (2012). Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria equi*) from carrier mares to foals. *Journal of Parasitic Diseases*, 36(1), 31–33.
- Christensen, M.B., Sørensen, J.C., Jacobsen, S. & Kjelgaard-Hansen, M. (2013). Investigation of the solubility and the potentials for purification of serum amyloid A (SAA) from equine acute phase serum—a pilot study. *BMC Research Notes*, 6(1), 152–162.

- Cowell, R.L. & Tyler, R.D. (2002). Peripheral Blood Smears. In K.S. Latimer & P.M. Rakich, *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. (2nd ed.). (pp 200-216). Missouri: Mosby.
- Crisman, M.V., Scarratt, W.K. & Zimmerman, K.L. (2008). Blood proteins and inflammation in the horse. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 24(2), 285–297.
- Cunha, C.W., McGuire, T.C., Kappmeyer, L.S., Hines, S.A., Lopez, A.M., Dellagostin, O.A. & Knowles, D.P. (2006). Development of specific immunoglobulin G_a (IgG_a) and IgG_b antibodies correlates with control of parasitemia in *Babesia equi* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(2), 297–300.
- Daniel, A.J., Leise, B.S., Burgess, B.A., Morley, P.S., Cloninger, M. & Hassel, D.M. (2016). Concentrations of serum amyloid A and plasma fibrinogen in horses undergoing emergency abdominal surgery. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 26(3), 344–351.
- Davalos, D. & Akassoglou, K. (2012). Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*, 34(1), 43–62.
- Deger, S., Deger, Y., Bicek, K., Ozdal, N. & Gul, A. (2009). Status of lipid peroxidation, antioxidants and oxidation products of nitric oxide in equine babesiosis: status of antioxidant and oxidant in equine babesiosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(10), 743–747.
- de Souza, M.V., de Souza, P.C., Rodrigues, B.L., Júnior, J.I.R. & Cordeiro, R.R. (2006). Concentração do fibrinogénio no plasma sanguíneo de equinos da raça Mangalarga Marchador por diferentes métodos. *Revista Ceres*, 53(307), 382–386.
- de Wall, D.T., van Heerden, J. & Potgieter, F.T. (1987). An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. *Journal of Veterinary Research*, 54(4), 561–568.
- de Wall, D.T. (1992). Equine piroplasmiasis: a review. *British Veterinary Journal*, 148, 6–14.
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2014). *Imizol - Resumo das características do medicamento*. Lisboa: DGAV.
- Donnelly, J., Phipps, L.P. & Watkins, K.L. (1982). Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *B. caballi* in foals of seropositive mares. *Equine Veterinary Journal*, 14(2), 126–128.
- Eckersall, P.D. (2000). Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151(7), 577–584.
- Erbsloh, J.K. (1975). Babesiosis in the newborn foal. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 23, 725–726.

- Escribano, D., Cihan, H., Martínez-Subiela, S., Levent, P., Kocaturk, M., Aytug, N., Céron, J.J., Tvarijonaviciute, A. & Yilmaz, Z. (2017). Changes in serum proteins in dogs with *Ehrlichia canis* infection. *Microbial Pathogenesis*, 113, 34–39.
- Farnaud, S. & Evans, R.W. (2003). Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40(7), 395–405.
- Frerichs, W.M., Allen, P.C. & Holbrook, A.A. (1973). Equine piroplasmiasis (*Babesia equi*): therapeutic trials of imidocarb dihydrochloride in horses and donkeys. *The Veterinary Record*, 93(3), 73–75.
- Frerichs, W.M. & Holbrook, A.A. (1974). Feeding mechanisms of *Babesia equi*. *The Journal of Protozoology*, 21(5), 707–709.
- Friedhoff, K.T. & Soulé, C. (1996). An account on equine babesiosis. *Revue Scientifique et Technique*, 15(3), 1191–1201.
- Friedhoff, K.T., Tenter, A.M. & Müller, I. (1990). Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 9(4), 1187–1194.
- Gabay, C. & Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 340(6), 448–454.
- Ganz, T. & Nemeth, E. (2015). Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 15(8), 500–510.
- Gavazza, A., Delgadillo, A.J., Gugliucci, B., Pasquini, A. & Lubas, G. (2002). Haematological alterations observed in equine routine complete blood counts. A retrospective investigation. *Comparative Clinical Pathology*, 11(3), 131–139.
- George, J.E., Davey, R.B. & Pound, J.M. (2002). Introduced ticks and tick-borne diseases: the threat and approaches to eradication. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 18(3), 401–416.
- Georges, K.C., Ezeokoli, C.D., Sparagano, O., Pargass, I., Campbell, M., d’Abadie, R. & Yabsley, M.J. (2011). A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Veterinary Parasitology*, 175(3-4), 363–366.
- Giguère, S., Berghaus, L.J. & Miller, C.D. (2016). Clinical assessment of a point-of-care serum amyloid A assay in foals with bronchopneumonia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(4), 1338–1343.
- Giguère, S., Hernandez, J., Gaskin, J., Miller, C. & Bowman, J.L. (2003). Evaluation of white blood cell concentration, plasma fibrinogen concentration, and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(6), 775–781.

- Gonzalez-Miranda, R.R., (2017). Caracterización clínica y laboratorial, incluyendo proteínas de fase aguda, en caballos positivos a *Theileria equi*. Dissertação de Doutorado em Medicina Veterinária. Córdoba: Universidade de Córdoba.
- Grause, J.F., Ueti, M.W., Nelson, J.T., Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S. & Bunn, T.O. (2013). Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses. *Veterinary Journal*, 196(3), 541–546.
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A. & Koopmans, S.J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science*. 6(11), 1045–1056.
- Hailat, N.Q., Lafi, S.Q., al-Darraj, A.M. & al-Ani, F.K. (1997). Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Veterinary Parasitology*, 69(1-2), 1–8.
- Hall, R., Adamson, R. & Boulter, N. (2002). Prime-boost: the way forward for recombinant vaccines against apicomplexan parasites. A *Theileria* perspective. *Parasitology Research*, 88(13), 45–47.
- Hanafusa, Y., Cho, K.O., Kanemaru, T., Wada, R., Sugimoto, C. & Onuma, M. (1998). Pathogenesis of *Babesia caballi* infection in experimental horses. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 60(10), 1127–1132.
- Harvey, J.W. (2001). Examination of Blood Samples. *Atlas of veterinary hematology. Blood and bone marrow of domestic animals*. (pp 3-74). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Heuchert, C.M.S., de Giulli Jr, V., de Athaide, D.F., Böse, R. & Friedhoff, K.T. (1999). Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 85(1), 1–11.
- Hoffman, J.S. & Benditt, E.P. (1983). Plasma clearance kinetics of the amyloid-related high density lipoprotein apoprotein, serum amyloid protein (apoSAA), in the mouse. Evidence for rapid apoSAA clearance. *The Journal of Clinical Investigation*, 71(4), 926–934.
- Holman, P.J., Frerichs, W.M., Chieves, L. & Wagner, G.G. (1993). Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(3), 698–701.
- Hooijberg, E.H., van der Hoven, R., Tichy, A. & Schwendenwein, I. (2014). Diagnostic and predictive capability of routine laboratory tests for the diagnosis and staging of equine inflammatory disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(5), 1587–1593.
- Hultén, C. & Demmers, S. (2002). Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen. *Equine Veterinary Journal*, 34(7), 693–698.

- Hultén, C., Grönlund, U., Hirvonen, J., Tulamo, R.M., Suominen, M.M., Marhaug, G. & Forsberg, M. (2010). Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 34(7), 699–704.
- Hultén, C., Sandgren, B., Skiöldebrand, E., Klingeborn, B., Marhaug, G. & Forsberg, M. (1999). The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 40(4), 323–333.
- Jacobsen, S. (2007). Review of equine acute-phase proteins. *AAEP Proceedings*, 53, 230–235.
- Jacobsen, S. & Andersen, P.H. (2007). The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education*, 19(1), 38–46.
- Jacobsen, S., Jensen, J.C., Frei, S., Jensen, A.L. & Thoenes, M.B. (2005). Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine Veterinary Journal*, 37(6), 552–556.
- Jacobsen, S., Nielsen, J.V., Kjelgaard-Hansen, M., Toelboell, T., Fjeldborg, J., Halling-Thomsen, M., Martinussen, T. & Thoenes, M.B. (2009). Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. *Veterinary Surgery*, 38(6), 762–769.
- Jacobsen, S., Niewold, T.A., Halling-Thomsen, M., Nanni, S., Olsen, E., Lindegaard, C. & Andersen, P.H. (2006). Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110(3-4), 325–330.
- Jaffer, O., Abdishakur, F., Hakimuddin, F., Riya, A., Wernery, U. & Schuster, R.K. (2010). A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitology Research*, 106(3), 709–713.
- Jefcoat, A.M., Wagner, J.G. & Robinson, N.E. (2003). The neutrophil: understanding ancient and powerful responses in the inflammatory balance. *Equine Veterinary Journal*, 35(1), 5–6.
- Jefferies, R., Ryan, U.M. & Irwin, P.J. (2007). PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology*, 144(1-2), 20–27.
- Kappmeyer, L.S., Thiagarajan, M., Herndon, D.R., Ramsay, J.D., Caler, E., Djikeng, A., Gillespie, J.J., Lau, A.O.T., Roalson, E.H., Silva, J.C., Silva, M.G., Suarez, C.E., Ueti, M.W., Nene, V.M., Mealey, R.H. & Knowles, D.P. (2012). Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics*, 13, 603
- Karreman, H.J., Wentink, G.H. & Wensing, T. (2000). Using serum amyloid A to screen dairy cows for sub-clinical inflammation. *The Veterinary Quarterly*, 22(3), 175–178.

- Kim, C., Blanco, L.B.C., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X. & Igarashi, I. (2008). Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Veterinary Parasitology*, 151(2-4), 158–163.
- Kjelgaard-Hansen, M. & Jacobsen, S. (2011). Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1), 51–70.
- Knowles Jr, D.P., Kappmeyer, L.S. & Perryman, L.E. (1994). Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. *Infection and Immunity*, 62(5), 1909–1913.
- Knutson, M.D. (2017). Iron transporters and iron homeostasis. In J. Collins. *Molecular, genetic, and nutritional aspects of major and trace minerals*. (pp 215-226). Massachusetts: Academic Press.
- Koj, A. (1996). Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochimica et biophysica acta*, 1317(2), 84–94.
- Kumar, S., Gupta, A.K., Pal, Y. & Dwivedi, S.K. (2003). *In-vivo* therapeutic efficacy trial with artemisinin derivative, buparvaquone and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 65(11), 1171–1177.
- Kumar, S., Malhotra, D.V., Dhar, S. & Nichani, A.K. (2002). Vaccination of donkeys against *Babesia equi* using killed merozoite immunogen. *Veterinary Parasitology*, 106(1), 19–33.
- Kuttler, K.L., Gipson, C.A., Goff, W.L. & Johnson, L.W. (1986). Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. *American Journal of Veterinary Research*, 47(8), 1668–1670.
- Laus, F., Spaterna, A., Faillace, V., Veronesi, F., Ravagnan, S., Beribé, F., Cerquetella, M., Meligrana, M. & Tesei, B. (2015). Clinical investigation on *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Italian donkeys. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 100–106.
- Lavoie-Lamoureux, A., Leclerc, M., Lemos, K., Wagner, B. & Lavoie, J.P. (2012). Markers of systemic inflammation in horses with heaves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(6), 1419–1426.
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Zúquete, S., Gomes, J., Walder, G., Domingos, A., Antunes, S., Baneth, G., Silaghi, C., Holman, P. & Zintl, A. (2017). Guidelines for the detection of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 17(1), 51–65.
- Lewis, B.D., Penzhorn, B.L., Volkmann, D.H. (1999). Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmiasis? *Journal of the South African Veterinary Association*, 70(2), 90–91.

- Lieu, P.T., Heiskala, M., Peterson, P.A. & Yang, Y. (2001). The roles of iron in health and disease. *Molecular aspects of Medicine*, 22(1-2), 1–87.
- Lindhorst, E., Young, D., Bagshaw, W., Hyland, M. & Kisilevsky, R. (1997). Acute inflammation, acute phase serum amyloid A and cholesterol metabolism in the mouse. *Biochimica et biophysica acta*, 1339(1), 143–154.
- Ludwig, E.K., Wiese, R.B., Graham, M.R., Tyler, A.J., Settlege, J.M., Were, S.R., Petersson-Wolfe, C.S., Kanevsky-Mullarky, I. & Dahlgren, L.A. (2016). Serum and synovial fluid serum amyloid A response in equine models of synovitis and septic arthritis. *Veterinary Surgery*, 45(7), 859–867.
- Malta, M.J.P.V. (2001). *Diagnóstico de Babesiose e Theileriose Equinas no Alentejo*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia Tropicais. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivcinkjak, T., Romić, Z., Simec, Z. & Ceron, J.J. (2007). Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 144(3-4), 242–250.
- McDonald, T.L., Larson, M.A., Mack, D.R. & Weber, A. (2001). Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 83(3-4), 203–211.
- Mehlhorn, H. & Schein, E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitology Research*, 84(6), 467–475.
- Meyer, C., Guthrie, A.J. & Stevens, K.B. (2005). Clinical and clinicopathological changes in 6 healthy ponies following intramuscular administration of multiple doses of imidocarb dipropionate. *Journal of the South African Veterinary Association*, 76(1), 26–32.
- Moltmann, U., Mehlhorn, H., Schein, E., Voigt, W.P. & Friedhoff, K.T. (1983). Ultrastructural study on the development of *Babesia equi* (coccidia: piroplasmia) in the salivary glands of its vector ticks. *The Journal of Protozoology*, 30(2), 218–225.
- Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina, A., Moretta, I., Gabrieli, S., Tampieri, M.P. & Pietrobelli, M. (2010). Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: A preliminary study. *Veterinary Journal*, 184, 346–350.
- Mosqueda, J., McElwain, T.F., Stiller, D. & Palmer, G.H. (2002). *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infection and Immunity*, 70(3), 1599–1603.
- Mujica, F.F., Perrone, T., Forlano, M., Coronado, A., Meléndez, R.D., Barrios, N., Álvarez, R. & Granda, F. (2011). Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. *Veterinary Parasitology*, 178, 180–183.

- National Center for Biotechnology Information (2018). *Primer Designing Tool*. Acedido em Abr. 15, 2018, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- National Institute of Health (2018). *Basic Local Alignment Search Tool*. Acedido em Abr. 24, 2018, disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabavan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K. & Ganz, T. (2004). IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(9), 1271–1276.
- Nolen-Walston, R. (2015). How to interpret serum amyloid A concentrations. *AAEP Proceedings*, 61, 130–137.
- Northrop-Clewes, C.A. (2008). Interpreting indicators of iron status during an acute phase response--lessons from malaria and human immunodeficiency virus. *Annals of Clinical Biochemistry*, 45(1), 18–32.
- Nunokawa, Y., Fujinaga, T., Taira, T., Okumura, M., Yamashita, K., Tsunoda, N. & Hagio, M. (1993). Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 55(6), 1011–1016.
- OIE (2018). Equine disease free zones (EDFZ). Acedido em Jan. 15, 2018, disponível em: <http://www.oie.int/our-scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/international-competition-horse-movement/equine-disease-free-zones/>
- OIE (2018). OIE–Listed diseases, infections and infestations in force in 2018. Acedido em Jan. 16, 2018, disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2018/>
- Oladosu, L.A. & Olufemi, B.E. (1992). Haematology of experimental Babesiosis and Ehrlichiosis in steroid immunosuppressed horses. *Zoonoses and Public Health*, 39(1-10), 345–352.
- Pasolini, M.P., Pagano, T.B., Costagliola, A., Biase, D., Lamagna, B., Auletta, L., Fatone, G., Greco, M., Coluccia, P., Vincenzo, V., Pirozzi, C., Raso, G.M., Santoro, P., Manna, G., Papparella, S. & Paciello, O. (2018). Inflammatory myopathy in horses with chronic piroplasmiasis. *Veterinary Pathology*, 55(1), 133–143.
- Peek, S.F., Semrad, S., McGuirk, S.M., Riseberg, A., Slack, J.A., Marques, F., Coombs, D., Lien, L., Keuler, N. & Darien, B.J. (2006). Prognostic value of clinicopathologic variables obtained at admission and effect of antitendotoxin plasma on survival in septic and critically ill foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(3), 569–574.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P. & Heegaard, P.M. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35(2), 163–187.

- Phil, T.H., Scheepers, E., Sanz, M., Goddard, A., Page, P., Toft, N., Kjelgaard-Hansen, M., Andersen, P.H. & Jacobsen, S. (2016). Acute-phase proteins as diagnostic markers in horses with colic. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 26(5), 664–674.
- Phipps, L.P. & Otter, A. (2004). Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, 154(13), 406–408.
- Pollock, P.J. (2017). *Studies exploring the potential use of Serum Amyloid A (SAA) and other equine acute phase proteins for the investigation, monitoring and prognostication of disease in horses*. Ph.D. Thesis. Scotland: School of Veterinary Medicine, College of Medicine, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow.
- Pollock, P.J., Prendergast, M., Schumacher, J. & Bellenger, C.R. (2005). Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. *The Veterinary Record*, 156(17), 538–542.
- Prasse, K.W., George, L.W. & Whitlock, R.H. (1981). Idiopathic hypersegmentation of neutrophils in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 178(3), 303–305.
- Pugliese, A., Gaiti, A. & Boiti, C. (2012). Serum Amyloid A, Fibrinogen, and Haptoglobin as Inflammation Markers in the Horse: Preliminary Results. In S. Prato, F. Passamonti, C. Tamantini, M. Cercone, S. Nannarone, C. Bazzica, R. Gialletti, C. Maggio, I. Cerasoli, A.D. Meo & M. Pepe (Eds.), *Veterinary Science. Current aspects in biology, animal pathology, clinic, and food hygiene*. Berlin: Springer.
- Ramaiah, S.K., Harvey, J.W., Giguère, S., Franklin, R.P. & Crawford, C. (2003). Intravascular hemolysis associated with liver disease in a horse with marked neutrophil hypersegmentation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(3), 360–363.
- Ramsay, J.D., Ueti, M.W., Johnson, W.C., Scoles, G.A., Knowles, D.P. & Mealey, R.H. (2013). Lymphocytes and macrophages are infected by *Theileria equi*, but T cells and B cells are not required to establish infection *in vivo*. *PLOS ONE*, 8(10), e76996.
- Rashid, H.B., Chaudhry, M., Rashid, H., Pervez, K., Khan, M.A. & Mahmood, A.K. (2008). Comparative efficacy of diminazene diacetate and diminazene aceturate for the treatment of babesiosis in horses. *Tropical Animal Health and Production*, 40(6), 463–467.
- Rego, B.M.C.D. (2008). *Estudo da infecção natural por protozoários dos géneros Babesia e Theileria numa exploração coudélica do Ribatejo*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa.
- Ribeiro, A.J., Cardoso, L., Maia, J.M., Coutinho, T. & Cotovio, M. (2013). Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. *Parasitology Research*, 112(7), 2611–2617.
- Rothschild, C. M. (2013). Equine piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(7), 497–508.

- Rudolph, W., Correa, J., Zurita, L. & Manley, W. (1975). Equine piroplasmosis: leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. *The British Veterinary Journal*, 131(5), 601–609.
- Salim, B., Bakheit, M.A., Kamau, J. & Sugimoto, C. (2013). Current status of equine piroplasmosis in the Sudan. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 191–199.
- Sant, C., d'Abadie, R., Pargass, I., Basu, A.K., Asgarali, Z., Charles, R.A. & Georges, K.C. (2016). Prospective study investigating transplacental transmission of equine piroplasmosis in thoroughbred foals in Trinidad. *Veterinary Parasitology*, 226, 132–137.
- Schwint, O.N., Ueti, M.W., Palmer, G.H., Kappmeyer, L.S., Hines, M.T., Cordes, R.T., Knowles, D.P. & Scoles, G.A. (2009). Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4327–4332.
- Sabino-Serra, J.M., da Fonseca, I.M.P., de Carvalho, L.M.M. & Carvalho-Varela, M. (1993). Estudo das parasitoses dos equídeos do Ribatejo: II Babesioses. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 1(2), 66.
- Silva, B. & Faustino, P. (2015). An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et biophysica acta*, 1852(7), 1347–1359.
- Silvey, R.E. (1996). Babesiosis in a foal. *The Veterinary Record*, 139(17), 428.
- Smith, J.E. & Cipriano, J.E. (1987). Inflammation-induced changes in serum iron analytes and ceruloplasmin of Shetland ponies. *Veterinary Pathology*, 24(4), 354–356.
- Stoneham, S.J., Palmer, L., Cash, R. & Rosedale, P.D. (2001). Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. *Equine Veterinary Journal*, 33(6), 599–603.
- Sumbria, D. & Singla, L.D. (2015). Recent diagnostic and control approaches in equine piroplasmosis. *Veterinaria*, 2(1), 1–6.
- Tamzali, Y. (2013). Equine piroplasmosis: An updated review. *Equine Veterinary Education*, 25(11), 590–598.
- Tamzali, Y., Guelfi, J.F. & Braun, J.P. (2001). Plasma fibrinogen measurement in the horse: comparison of Millar's technique with a chronometric technique and the QBC-Vet Autoreader. *Research in Veterinary Science*, 71(3), 213–217.
- Thiemann A. & Phipps, P. (2009, Julho-Setembro). The risk of importation of equine piroplasmosis into the United Kingdom. *AHT/BEVA/DEFRA Equine Quarterly Disease Surveillance Report*, 5(3), 16–17.
- Thornton, B. & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39(2), 145–154.

- Ueti, M.W., Palmer, G.H., Scoles, G.A., Kappmeyer, L.S. & Knowles, D.P. (2008). Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. *Infection and Immunity*, 76(8), 3525–3529.
- Ueti, M.W., Mealey, R.H., Kappmeyer, L.S., White, S.N., McWhirter, N.K., Pelzel, A.M., Grause, J.F., Bunn, T.O., Schwartz, A., Dargatz, J.L.T., Hendrickson, A., Espy, B., Guthrie, A.J., Fowler, W.K. & Knowles, D.P. (2012). Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission Risk. *PLOS ONE*, 7(9), e44713.
- Upragarin, N., Landman, W.J., Gaastra, W. & Gruys, E. (2005). Extrahepatic production of acute phase serum amyloid A. *Histology of Histopathology*, 20(4), 1295–1307.
- Vallon, R., Freuler, F., Desta-Tsedu, N., Robeva, A., Dawson, J., Wenner, P., Engelhardt, P., Boes, L., Schnyder, J., Tschopp, C., Urfer, R. & Baumann, G. (2001). Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases. *Journal of Immunology*, 166(4), 2801–2807.
- Vandenplas, M.L., Moore, J.N., Barton, M.H., Roussel, A.J. & Cohen, N.D. (2005). Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic. *American Journal of Veterinary Research*. 66(9), 1509–1516.
- van der Kolk, J.H. (2016). Lyme borreliosis in the horse: a mini-review. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4(1), 196–202.
- Viatte, L., Gröne, H.J., Hentze, M.W. & Galy, B. (2009). *In vivo* role(s) of the iron regulatory proteins (IRP) 1 and 2 in aseptic local inflammation. *Journal of Molecular Medicine*, 87(9), 913–921.
- Viner, M., Mazan, M., Bedenice, D., Mapes, S. & Pusterla, N. (2017). Comparison of serum amyloid A in horses with infectious and noninfectious respiratory diseases. *Journal of Equine Veterinary Science*, 49, 11–13.
- Vinhas, A.R.B. (2014). *Seroprevalência de Theileria equi em Portugal*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- WAHIS (2018). Control measures maps. Acedido em Jan. 16, 2018, disponível em: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseasecontrol/controlmeasuresmap
- WAHIS (2018). Disease control measures. Acedido em Jan. 16, 2018, disponível em: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseasecontrol/measures
- WAHIS (2018). Disease information. Immediate notifications and follow-ups. Acedido em Jan. 16, 2018, disponível em: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary
- Weisel, J.W. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 247–299.

- Westerman, T.L., Foster, C.M., Tornquist, S.J. & Poulsen, K.P. (2016). Evaluation of serum amyloid A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with colic. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 248(8), 935–940.
- Wise, L.N., Kappmeyer, L.S., Mealey, R.H. & Knowles, D.P. (2013). Review of equine piroplasmosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27, 1334–1346.
- Yang, S. & Rothman, R.E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet. Infectious Diseases*, 4(6), 337–348.
- Yokoyama, N., Okamura, M. & Igarashi, I. (2006). Erythrocyte invasion by Babesia parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology*, 138 (1-2), 22–32.
- Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R. & Parpaglia, M.L.P. (2008). Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(5), 301–308.

9. Anexos

Anexo 1 – Questionário enviado aos veterinários referentes para preenchimento aquando do envio de amostras para análise. Original.



PIROPLASMOSE EQUINA: ALTERAÇÕES DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

QUESTIONÁRIO

(a preencher pelo médico veterinário)

IMPORTANTE: No envelope devem ser enviados, juntamente com este questionário: sangue num tubo de EDTA e sangue num tubo de heparina.

DATA: ____/____/____

RESULTADOS ANÁLISES LABORATORIAIS (assinalar com x)

Pretendo receber o resultado do teste de PCR *Theileria* / *Babesia* (custo de 20€ + IVA) ☐

Pretendo receber o resultado dos testes de Hematologia, Fibrinogénio e Amilóide Sérica A (custo de 21€ + IVA) ☐

DADOS DO MÉDICO VETERINÁRIO:

Nome do Médico Veterinário: _____

Contacto telefónico: _____

E-mail: _____

Morada: _____

NIF: _____ (se é a primeira vez que está a enviar análises para este estudo, por favor indique os seus (não os do proprietário) dados de facturação)

DADOS GERAIS DO CAVALO:

Nome: _____ Proveniência (concelho): _____

Idade: _____ Raça: _____

Género: M / F

Se M: Garanhão / Castrado

Se F: Gestante? S / N

HISTÓRIA PREGRESSA:

Alguma vez foi diagnosticado com piroplasmose: S / N

Se sim, quando e que teste foi realizado? _____

Febre nas últimas 72 horas? S / N

Se sim, quantificar: _____ °C

Coloração das mucosas: Normais ☐ Pálidas ☐ Congestionadas ☐ Cianóticas ☐ Ictéricas ☐

Outros sinais clínicos observados:

Perda de Appetite ☐

Fraqueza ☐

Depressão ☐

Perda de peso ☐

Edemas ☐

Linfadenomegália ☐

Mialgia ☐

Alteração na estabulação recentemente? S / N

Se sim, qual? _____

Alguma viagem/transporte recentemente? S / N

Se sim, descrever: _____

Problemas médicos prévios? S / N

Se sim, qual/quais? _____

Anexo 2 – Intervalos de referência dos parâmetros avaliados no hemograma. Adaptado dos valores de referência considerados para a espécie equina pelo equipamento utilizado.

ERITROGRAMA		
Parâmetro	Unidades	Intervalo de Referência
Eritrócitos	$\times 10^6$ células/ μ L	5,5-9,5
Hematócrito	%	24-44
Hemoglobina	g/dL	8-14
VCM	fl	37-58,5
HCM	pg	12,3-19,9
CHCM	g/dL	31-38,6
LEUCOGRAMA		
Parâmetro	Unidades	Intervalo de Referência
Leucócitos	$\times 10^3$ células/ μ L	6-12
Neutrófilos segmentados	células/ μ L	600-4000
Neutrófilos não segmentados	células/ μ L	0-120
Linfócitos	células/ μ L	2500-7500
Monócitos	células/ μ L	0-800
Eosinófilos	células/ μ L	0-925
Basófilos	células/ μ L	0-170
TROBOGRAMA		
Parâmetro	Unidades	Intervalo de Referência
Plaquetas	$\times 10^3$ / μ L	100-350

Anexo 3 – Valores de $\bar{x} \pm \sigma$ e $\tilde{x} + \text{IQR}$ registrados para os respectivos parâmetros avaliados no hemograma. Original.

ERITROGRAMA			
Parâmetro	Grupo PC	Grupo NS	Grupo SC
Eritrócitos ($\times 10^6$ células/ μL)	$7,5 \pm 1,6$	$6,9 \pm 1,3$	$7,5 \pm 1,1$
Hematócrito (%)	$33,1 \pm 6,5$	$31,7 \pm 6,7$	$34,6 \pm 5,7$
Hemoglobina (g/dL)	$11,8 \pm 2,3$	$11,7 \pm 2,5$	$12,4 \pm 1,6$
VCM (fl)	$44,5 \pm 3,0$	$45,9 \pm 3,1$	$46,0 \pm 1,8$
HCM (pg)	$15,8 \pm 0,6$	$17,0 \pm 1,0$	$16,6 \pm 0,6$
CHCM (g/dL)	$35,7 \pm 1,4$	$37,0 \pm 1,5$	$36,1 \pm 1,2$
LEUCOGRAMA			
Parâmetro	Grupo PC	Grupo NS	Grupo SC
Leucócitos ($\times 10^3$ células/ μL)	$10,4 \pm 4,3$	$8,3 \pm 3,8$	$8,4 \pm 1,0$
Neutrófilos segmentados (células/ μL)	$6058,0 + 5409,0$	$5370,0 + 3746,0$	$4317,0 + 1195,8$
Neutrófilos não segmentados (células/ μL)	$0 + 186,0$	$0 + 0$	$0 + 0$
Linfócitos (células/ μL)	$1674,0 + 860,0$	$1534,5 + 1373,3$	$3077,0 + 1342,5$
Monócitos (células/ μL)	$530,0 + 849,0$	$293,0 + 295,8$	$126,5 + 77,3$
Eosinófilos (células/ μL)	$0 + 0$	$33,5 + 60,0$	$90,0 + 209,8$
Basófilos (células/ μL)	$0 + 0$	$10,0 + 27,5$	$0 + 0$
TROMBOGRAMA			
Parâmetro	Grupo PC	Grupo NS	Grupo SC
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$138,0 + 141,0$	$172,0 + 64,5$	$233,5 + 113,8$